



## ESTUDOS DE BIODISPONIBILIDADE DA CIPROFLOXACINA A GRÂNULOS AERÓBIOS



Bruno Manuel Fernando Macule

MESTRADO EM CONTROLO DA QUALIDADE



# Estudos de biossorção da ciprofloxacina a grânulos aeróbios

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em  
Controlo da Qualidade

Bruno Manuel Fernando Macule

Trabalho realizado sob a orientação de:

Professor Doutor Carlos Manuel Magalhães Afonso

E sob a co-orientação de:

Professora Doutora Paula Maria Lima Castro

Professora Doutora Maria Elizabeth Tiritan

Setembro, 2014

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO  
APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO  
ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus todo-poderoso pela sua misericórdia e graça. A frequência do curso de Mestrado em Controlo da Qualidade foi um dos mais importantes desafios académicos que já tive de enfrentar. Sem o apoio, paciência e orientação dos que passarei a citar, este estudo não teria sido possível. Nesta ocasião, gostaria de agradecer profundamente aos seguintes:

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por me ter dado a oportunidade de formação em Mestrado em Controlo da Qualidade e à Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, pela oportunidade que me concedeu na realização de experiências com os biomateriais usados nesta tese (grânulos aeróbios).

Ao meu supervisor, Professor Doutor Carlos Afonso, que me aceitou como seu estudante e sempre com a sua dedicação, visão crítica, me orientou durante todas as fases da realização deste trabalho. O Professor Carlos Afonso me ajudou desde a minha chegada e mostrou-se disponível para me ajudar sempre que eu precisasse.

À minha co-supervisora Professora Maria Elizabeth Tiritan, pela sua sabedoria, visão crítica, colaboração e pela sua excelente capacidade de orientação.

À minha co-supervisora Professora Paula Castro pela orientação e por me fornecer um excelente ambiente para fazer a pesquisa.

À Doutora Catarina Amorim pela orientação durante as experiências de biossorção. Agradeço também pela sua simpatia e por sempre me ter recebido de braços abertos durante a realização das experiências na Escola Superior de Biotecnologia.

À Dra Sara Cravo pela orientação e pelo apoio prestado durante o trabalho com o HPLC e FTIR.

À Alexandra Maia por me ter recebido muito bem na CESPU e ter me ensinado a trabalhar com o HPLC.

À Umbe Neves pela amizade, companhia e ajuda.

À Vanessa Regina pelas dicas importantes que deu durante os trabalhos laboratoriais.

Ao projeto de bolsas do Ministério de Ciência e Tecnologia de Moçambique pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a minha estadia na cidade do Porto.

Aos meus pais, Manuel F. Macule e Celeste F. Guiamba, e aos meus irmãos que mesmo distantes sempre acreditaram em mim e deram muita força.

## Abstract

Environmental contamination by antibiotics is a major cause for concern causing problems such as bacterial resistance. It is important to have efficient methods of removing these contaminants. In this work, several tests were performed to evaluate the removability of ciprofloxacin (CPF) by aerobic granules. The effect of granule size, the concentration of the biosorbents, the initial concentration of CPF and the influence of temperature were investigated on biosorption process. Active granules smaller than 1 mm removed more CPF (44.6%) than active granules with sizes between 1-2 mm (36.9%). Inactive granules smaller than 1 mm remove more CPF (34.9%) compared to those with size between 1-2 mm (28.6%) after 24 h. The pseudo first and second order models are applied to describe the biosorption process of CPF in active granules while the pseudo-first order model was applicable in the inactive granules. The analysis of the experimental and theoretical profiles at 285 K (12 °C) showed that the Freundlich model was the most appropriate for the prediction of isothermal profiles at this temperature. At 298 K (25 °C) both the Langmuir and Freundlich models explained the process of biosorption of CPF. At 313 K (40 °C) the Freundlich model was the most appropriate at the lower concentration range (25 to 100 mg L<sup>-1</sup>) while the Langmuir model was the most appropriate at the higher concentration range (200-800 mg L<sup>-1</sup>). These observations suggest that the sorption process happens in an heterogeneous surface at low concentrations but higher concentrations led to homogeneity of the granules surface that may have dictated the change in the biosorption model. Thermodynamic studies indicated that the biosorption process was spontaneous and exothermic and occurs through a chemisorption process. FTIR analysis of the aerobic granules before and after the biosorption of CPF also indicates that possibility. Functional groups in the surface of biomass, such as N-H, O-H, C-H and C=O are the possible binding sites in the process. The fact that the biosorption process of CPF by aerobic granules is spontaneous at all studied temperatures and exothermic (needing not large supplies of heat to occur), adsorb via chemical and physical forms, suggests that the aerobic granules are promising environmental adsorbents of CPF and possibly other compounds with similar structure.

Keywords: biosorption, aerobic granules, adsorption isotherms, ciprofloxacin, FTIR.

## Resumo

A contaminação ambiental por antibióticos é um motivo de grande preocupação provocando problemas como a resistência bacteriana. É assim importante dispor de métodos eficientes de remoção destes contaminantes no ambiente. Neste trabalho, foram realizados vários ensaios para avaliar a capacidade de remoção da ciprofloxacina (CPF) por bioadsorção a grânulos aeróbios. A influência das dimensões dos grânulos usados, a concentração do bioadsorvente, a concentração inicial de CPF e temperatura sobre a bioadsorção foram investigados. Os grânulos ativos menores de 1 mm removem mais CPF (44.6%) do que os grânulos ativos com tamanhos entre 1-2 mm (36.9%). Os grânulos inativos menores de 1 mm removem mais CPF (34.9%) em relação aos grânulos inativos com o tamanhos entre 1-2 mm (28.6%) após 24 h. Os modelos de pseudo primeira e segunda ordem foram aplicáveis para descrever o processo de bioadsorção da CPF em grânulos ativos enquanto que o modelo de pseudo primeira ordem foi mais aplicável em grânulos inativos. A análise dos perfis experimentais e teóricos a 285 K (12°C) revelou que o modelo de Freundlich é o mais apropriado para a previsão dos perfis isotérmicos a esta temperatura. À temperatura de 298 K (25°C) o modelo de Langmuir, e Freundlich explicam o processo de bioadsorção da CPF. A 313 K (40°C), o modelo de Freundlich foi o mais apropriado no intervalo mais baixo de concentrações (25 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) enquanto que o modelo Langmuir é o mais apropriado no intervalo de concentrações mais alto (200 a 800  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Estes dados sugerem que o processo de adsorção ocorre numa superfície heterogênea quando a CPF está em concentrações baixas mas que em concentrações mais elevadas ocorre uma maior homogeneidade na superfície dos grânulos ditando assim uma mudança no modelo de bioadsorção. Estudos termodinâmicos indicaram que o processo de bioadsorção é espontâneo e exotérmico e ocorre por meio de quimioadsorção. A análise FTIR dos grânulos, antes e depois da bioadsorção da CPF indica também que o processo é essencialmente por quimioadsorção. Os grupos funcionais à superfície da biomassa, tais como N-H, O-H, C-H, e C-O nos grânulos aeróbios ativos são os possíveis locais de ligação no processo de quimioadsorção. O fato deste processo ser espontâneo a todas as temperaturas estudadas, ser exotérmico (não requerendo grande quantidade de calor para ocorrer), e que a adsorção pode acontecer de forma química e física, sugere que os grânulos aeróbios são adsorventes promissores ambientais da CPF e, possivelmente, de outras substâncias com estrutura similar.

Palavras-chave: bioadsorção, grânulos aeróbios, isothermas de adsorção, ciprofloxacina, FTIR.

## Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumos.....	iv
Índice .....	vi
Índice de figuras.....	viii
Índice de tabelas.....	ix
Lista de abreviaturas e símbolos .....	x
1. Introdução .....	1
2. Materiais e métodos.....	3
2.1. Reagentes.....	3
2.2. Soluções padrão e soluções problema.....	4
2.3. Equipamento.....	4
2.3.1. HPLC-FD.....	4
2.3.2. FTIR.....	5
2.4. Parâmetros de validação do HPLC-FD.....	5
2.5. Estudos de bio sorção da CPF em grânulos aeróbios.....	5
2.5.1. Estudos de bio sorção da CPF de acordo com a concentração do biossorvente .....	7
2.5.2. Estudos cinéticos de bio sorção da CPF em grânulos aeróbios ativos e inativos de acordo com as dimensões .....	7
2.5.3. Estudos das isotermas de equilíbrio de bio sorção da CPF em grânulos aeróbios ativos à diferentes temperaturas.....	8
2.5.4. Estudos dos mecanismos de interação da CPF com grânulos aeróbios pelo FT-IR .....	9
3. Resultados e discussão .....	9
3.1. Otimização do método HPLC-FD.....	9
3.2. Validação do método HPLC-FD .....	10
3.3. Estudos cinéticos do processo de bio sorção .....	12
3.3.1. Efeito da concentração do biossorvente no processo de bio sorção.....	13
3.3.2. Efeito do tamanho da partícula no processo de bio sorção.....	14
3.3.3. Modelo de difusão intrapartícula de Weber e Morris.....	18
3.4. Isotermas de adsorção no equilíbrio .....	19

## Índice (cont.)

3.4.1. Modelos de equilíbrio de biossorção .....	21
3.4.2. Análise termodinâmica dos dados de biossorção isotérmica .....	25
3.5. Avaliação dos mecanismos de interação da CPF com os grânulos aeróbios ativos por FTIR.....	26
4. Conclusões .....	28
Bibliografia.....	30
Anexos.....	36



## Índice de figuras

Fig. 1. Estrutura da ciprofloxacina.....	1
Fig. 2. (a) Espécies ionizadas de CPF ( $\text{CPF}^+$ , $\text{CPF}^{+-}$ e $\text{CPF}^-$ ); (b) Espécies de CPF presentes a diferentes pHs do meio.....	1
Fig. 3. O biorreator usado para a obtenção dos grânulos (à direita).....	6
Fig. 4. Morfologia dos grânulos aeróbios ativos (esquerda) e inativos (direita).....	8
Fig. 5. Optimização das condições de eluição para a análise.....	10
Fig. 6. Avaliação da seletividade do método (a) suspensão de grânulos em meio sintético; (b) suspensão de grânulos em meio sintético adicionada de CPF, e (c) solução de CPF em meio sintético (concentração de CPF: 5 $\mu\text{g/L}$ ).....	10
Fig. 7. Curva de calibração: 1 a 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	11
Fig. 8. Efeito da concentração de biossorvente. (a) quantidade de CPF presente ao longo do tempo; (b) quantidade de CPF adsorvida ao longo do tempo.....	13
Fig. 9. Efeito do tamanho dos grânulos aeróbios ativos na biossorção (a) concentração da CPF presente ao longo do tempo; (b) capacidade de biossorção ( $q_t$ ) ao longo do tempo .....	14
Fig. 10. Efeito do tamanho dos grânulos inativos na biossorção (a) concentração da CPF presente ao longo do tempo; (b) capacidade de biossorção ( $q_t$ ) ao longo do tempo.....	16
Fig. 11. Efeito da concentração inicial da CPF na biossorção às temperaturas 285 K, 298 K e 313 K; ( $C_0 = 25\text{--}800 \mu\text{g L}^{-1}$ , $m = 0.75 \text{ g L}^{-1}$ , peso seco, $V = 50 \text{ mL}$ , $\text{pH} = 6.8$ ).....	20
Fig. 12. Comparação entre isothermas experimental e teórica (Langmuir e Freundlich) para biossorção de CPF em grânulos aeróbios. (a) 285 K; (b) 298 K e (c) 313 K. Condições de biossorção: $\text{pH } 6.8$ , peso de biomassa seca = $0,75 \pm 0,05 \text{ g}$ em 50 mL, 120 rpm, 48 h.....	23
Fig. 13. Espectros no IV de grânulos: (a) antes da biossorção da CPF e (b) depois das experiências de biossorção com 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	27

## Índice de tabelas

Tabela 1. Parâmetros da curva de calibração, limite de detecção e limite de quantificação .....	11
Tabela 2. Exatidão, precisão e ensaios inter e intradia.....	12
Tabela 3. Comparação das constantes cinéticas da biosorção da CPF para diferentes dimensões de grânulos.....	17
Tabela 4. Parâmetros do modelo de difusão de Webb e Morris para os grânulos ativos e inativos.....	19
Tabela. 5. Constantes isotérmicas de Langmuir e Freundlich para a biossorção de CPF em grânulos aeróbios a temperaturas variadas.....	24
Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos para a biossorção de CPF em grânulos aeróbios.....	25

## Lista de abreviaturas e símbolos

$b$	constante de Langmuir
$C$	constante relacionada com a espessura da camada fronteira
$C_0$	concentração da substância na fase líquida, no início $t_0$
$C_e$	concentração da substância na fase líquida no equilíbrio
$C_t$	concentração da substância na fase líquida no tempo $t$
CPF	ciprofloxacina
CV	coeficiente de variação
$\Delta G^0$	variação da energia livre padrão de Gibbs
$\Delta H^0$	variação de entalpia padrão
$\Delta S^0$	variação de entropia padrão
ETAR	estação de tratamento de águas residuais
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier
$h$	taxa de bioadsorção específica
HPLC-FD	cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência
$k_1$	constante de bioadsorção de pseudo primeira ordem
$k_2$	constante de bioadsorção de pseudo segunda ordem
$K_F$	constante de Freundlich
$K_c$	constante de equilíbrio
$k_p$	constante da taxa de difusão intrapartícula
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
IV	infra-vermelho
$M$	massa (g)
$n$	intensidade de bioadsorção
$q_{calc}$	capacidade de adsorção teórica/calculada
$q_e$	capacidade de adsorção no equilíbrio
$q_{exp}$	capacidade de adsorção experimental

## Abreviaturas e símbolos (cont.)

$q_{m\acute{a}x}$	capacidade de biossorção máxima
$q_t$	capacidade de adsorção no tempo $t$
$R$	constante universal dos gases
$\%R$	percentagem de remoção
$R_L$	fator de separação
$t$	tempo
$T$	temperatura
$t_R$	tempo de retenção
$V$	volume

## 1. Introdução e objetivos

Os antibióticos são uma família de fármacos essenciais no tratamento de infecções humanas animais e vegetais (Aksu & Tunç 2005). A ciprofloxacina (CPF) (ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-il-1H-quinolina-3 carboxílico) pertence à família das fluoroquinolonas. É um agente antibacteriano com actividade contra bactérias gram-negativas e gram-positivas (Zhanel 2002). A estrutura da CPF (Fig. 1) consiste num esqueleto de anel aromático bicíclico, com um grupo carboxílico ácido ( $pK_a = 6.09$ ) e um grupo piperazinil básico ( $pK_a = 8.74$ ) (Zhang et al. 2012).

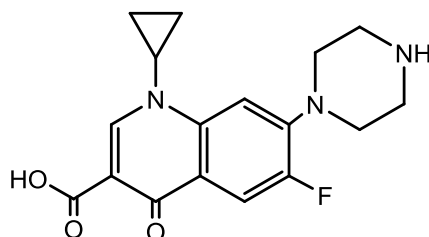


Fig. 1. Estrutura da ciprofloxacina.

Dependendo do pH do meio, a CPF pode existir como catião ( $CPF^+$ ), zwitterião ( $CPF^{\pm}$ ), ou anião ( $CPF^-$ ), Fig. 2 (Zhang et al. 2012).

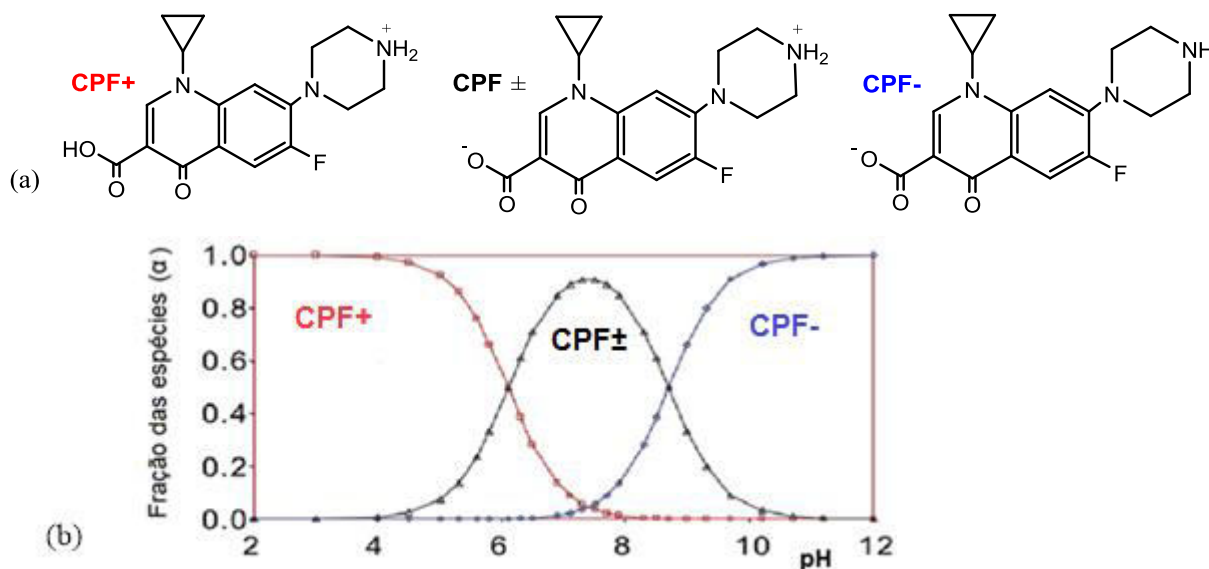


Fig. 2. (a) Espécies ionizadas de CPF ( $CPF^{\pm}$ ,  $CPF^+$  e  $CPF^-$ ); (b) Fração das espécies de CPF a diferentes pHs do meio (adaptado em Wu et al. 2013).

A CPF é a fluoroquinolona mais prescrita na Europa e entre 50 a 68% da CPF ingerida é excretada não metabolizada pela urina e pelas fezes. A CPF é frequentemente detetada no ambiente e recentemente foram isoladas estirpes resistentes à CPF em biofilmes e sedimentos de uma estação de tratamento de águas residuais (Marti et al. 2014). Além disso, a CPF é o principal metabolito da enrofloxacin, uma fluoroquinolona vulgarmente utilizada em veterinária (Girardi et al. 2011). A CPF foi detectada quase que ubiquamente em níveis de centenas de  $\text{ng L}^{-1}$  em águas de superfície, de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  nos efluentes secundários de estações de tratamento de águas residuais e de  $\text{mg L}^{-1}$  em efluentes de hospitais e de indústrias farmacêuticas. Estes factos, só por si, seriam de grande preocupação, contudo, há que acrescentar o grave problema de resistência bacteriana devido à exposição prolongada da CPF aos microrganismos (Zhang et al. 2012, Dorival-Garcia et al. 2013, Marti et al. 2014 & Doménech et al. 2015).

É assim importante dispor de métodos eficientes de remoção da CPF e outros fármacos do ambiente. Durante os últimos anos, vários métodos de tratamento de águas residuais têm sido usados com esse objetivo, tais como o uso de um terreno húmido (“wetland”) de escoamento superficial (Berglund et al. 2014), utilização de radiação ultravioleta (Yang et al. 2014), métodos de oxidação avançada (Von Sonntag 2014) e processos de adsorção e/ou biodegradação (Fan et al. 2014). A biossorção é a forma de adsorção que envolve a utilização de materiais biológicos como biossorvente (Gao et al. 2010)<sup>a</sup>. Na literatura estão descritos vários biossorventes passíveis de serem usados na remoção de contaminantes (fármacos, metais e corantes, etc.). Entre eles estão as lamas ativadas (Aksu & Tunç 2005), resíduos vegetais (Villaescusa et al. 2011), cortiça (Crespo-Alonso et al. 2013, Olivella et al. 2013), fungos (Patel & Suresh 2008, Zhang & Geissen 2012) e grânulos aeróbios (Liu et al. 2002, de Kreuk et al. 2005, Gao et al. 2010<sup>a</sup>, Wang et al. 2013) entre outros materiais.

A produção de grânulos aeróbios é considerada como uma das biotecnologias promissoras no tratamento de águas residuais (Adav et al. 2008). Os grânulos aeróbios podem ser cultivados rapidamente utilizando lamas ativadas como inóculo em reatores sequenciais (SBRs), com uma variedade de substratos alimentares, incluindo a glicose, acetato, etanol, fenol, águas residuais sintéticas e reais (Gao et al. 2010)<sup>a</sup>. Comparados com as lamas ativadas convencionais, os grânulos aeróbios sedimentam mais facilmente (Adav et al. 2009), são de produção mais barata, não produzem metabolitos tóxicos e são amigos do ambiente, proporcionando assim uma forma desejável de tratamento e reciclagem de águas residuais (Aksu 2005, Vijayaraghavan & Yun 2008, Wu, Li et al. 2012).

A biossorção é um fenómeno essencialmente de adsorção e pode ser física (interação eletrostática e forças de van der Waals) ou química (troca iónica, o deslocamento de protões, complexação e quelação) (Michalak et al. 2013). Os grânulos são formados por resíduos bacterianos contendo substâncias poliméricas extracelulares (EPS), compostos maioritariamente por proteínas, polissacáridos, ácidos húmicos e ácidos nucleicos, lípidos e outros materiais diversos (Gao et al. 2011, Gao et al. 2011 (Seviour et al. 2012). Estas macromoléculas disponibilizam para ligação grupos OH, NH e cadeias alifáticas, entre outros, e o processo de biossorção é controlado por interações entre esses grupos funcionais e partes alifáticas da CPF e os grupos funcionais e alifáticos dos grânulos (Zhu et al. 2012).

O objectivo deste trabalho foi de avaliar a viabilidade da utilização dos grânulos aeróbios cultivados em reatores (SBR) como biossorventes da CPF, simulando no laboratório as condições ambientais, de modo que possam ser utilizados futuramente para a remoção de CPF e compostos relacionados no ambiente. A influência das dimensões dos grânulos aeróbios, da concentração dos grânulos, da concentração inicial da CPF e da temperatura na biossorção foram avaliados usando estudos cinéticos, isotérmicos e termodinâmicos. Foram também estudados os mecanismos de interação no processo de biossorção da CPF a grânulos aeróbios ativos usando a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Reagentes**

A ciprofloxacina (>99.9% de pureza) foi adquirida na Sigma Aldrich. O metanol (> 99% de pureza) foi adquirido na Merck. A trietilamina (≥99% de pureza) foi obtido na Sigma-Aldrich. O ácido acético (>99% de pureza) e o ácido trifluoroacético foram comprados na Panreac e Acros Organics, respectivamente. A água foi fornecida por um sistema de purificação de água Milli-Q.

## **2.2. Soluções padrão e soluções problema**

Solução padrão (a): CPF ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ); A CPF foi dissolvida numa solução de água/ácido acético (95:5 V/V). A solução foi conservada a  $-20^\circ\text{C}$  e em frascos de âmbar até ser utilizada.

Solução padrão (b): CPF ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) A solução padrão (a) foi diluída 10 vezes numa solução de meio sintético/ácido acético (95:5 V/V). Esta solução foi usada para preparar os padrões usados na construção das curvas de calibração e em todas as experiências de bioadsorção, após diluições apropriadas.

Meio sintético: o meio sintético de alimentação teve a seguinte composição por litro: 0.0484 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , 0.083g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.033 g  $\text{KCl}$ , 0.056 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.027g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.177  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , e 0.9375 mL de uma solução de micro-elementos (Vishniac) cuja composição por litro compreende: 63.77g  $\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 22g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5.54g  $\text{CaCl}_2$ , 5.06g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 4.99g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.1g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.57g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.879 g  $\text{CoCl}_2$ . O pH foi ajustado a 6 (de Kreuk et al. 2005).

Soluções problema: As soluções problema foram obtidas durante as experiências de bioadsorção, descritas na secção 2.5.

## **2.3. Equipamento**

### **2.3.1. HPLC-FD**

Foi usado um sistema HPLC Finningan<sup>TM</sup> Surveyor<sup>®</sup> Plus equipado com uma bomba quaternária, um desgaseificador e um injetor automático Finningan<sup>TM</sup> Surveyor<sup>®</sup> Plus controlado pelo programa Dionex Chromeleon version 7.1.2.1713. Foi usado um detector de fluorescência Thermoscientific Ultimate 3000 e uma coluna Luna pentafluorofenil (2) (150 mm  $\times$  4.6 mm), com diâmetro do poro de  $100 \text{ \AA}$  e tamanho da partícula de  $3.0 \text{ }\mu\text{m}$ . As análises decorreram em eluição isocrática, com uma fase móvel constituída por uma mistura de 0,1% de trietilamina em água ultrapura, acidificada com ácido trifluoroacético até pH 2.2 (eluente A) e metanol (eluente B), 58:42 (V/V). O fluxo foi de  $0,70 \text{ mL min}^{-1}$  e a temperatura do forno da coluna foi de  $45^\circ\text{C}$ . O volume de injeção foi de  $10 \text{ }\mu\text{L}$ . O detector de fluorescência foi mantido nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 290 e 460 nm respetivamente.



### **2.3.2. FTIR**

Foi usado um espectrofotômetro FTIR ThermoFisher Scientific Nicolet™ iS™ 10 para a obtenção dos espectros no IV. Todos os espectros foram obtidos no intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução da aquisição de 1  $\text{cm}^{-1}$ . As intensidades das absorções nos espectros foram normalizadas em relação à escala de transmitância e, a linha de base corrigida automaticamente.

### **2.4. Parâmetros de validação do HPLC-FD**

O método cromatográfico foi validado de acordo com as diretrizes da FDA (2001) tendo sido estudados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, intervalo de linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e precisão. A selectividade foi verificada comparando os cromatogramas obtidos com as seguintes soluções: solução do meio sintético com os grânulos; meio sintético com os grânulos mais a CPF e meio sintético com CPF. A linearidade e o intervalo de linearidade foram obtidos construindo uma curva de calibração a partir de oito concentrações de CPF em meio sintético acidificado com 5% de ácido acético (pH~2.4): 1, 5, 25, 50, 100, 250, 500 e 750  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

O LD e o LQ foram calculados através de soluções de CPF que originaram uma razão sinal/ruído de 3 e 10 para o LD e LQ respetivamente.

A exatidão e precisão intra e inter-dia foram avaliadas a partir de soluções de CPF com três concentrações diferentes (3, 375 e 560  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) analisadas em triplicado e em três dias consecutivos. A precisão foi expressa em termos coeficiente de variação nas medições (CV). A exatidão foi obtida pela comparação dos resultados experimentais obtidos com as soluções analisadas e as concentrações teóricas e foi expressa em termos de percentagem do erro relativo.

### **2.5. Estudos de bioadsorção da CPF a grânulos aeróbios**

Os grânulos aeróbios foram obtidos de um reator laboratorial de 2.5 L de volume em operação a cerca de 2 anos (Fig. 3). O reactor tem uma altura de 110 cm e um diâmetro interno de 6.5 cm. Lamas activadas de uma ETAR municipal foram utilizadas como inóculo para o arranque do biorreator e formação dos grânulos aeróbios.



Fig. 3. O biorreator usado para a obtenção dos grânulos (à direita)

O reator foi operado continuamente em sucessivos ciclos. Cada ciclo consistiu em 4 fases consecutivas: entrada de influente, reacção, sedimentação e saída de efluente. Durante a fase de enchimento (duração: 60 min), 0.95 L de meio sintética são bombeados para o biorreator. Na fase de reacção (duração: variável, de acordo com tempo total do ciclo), o arejamento é introduzido na parte inferior do reactor ( $4 \text{ L min}^{-1}$ ; velocidade superficial do ar de  $84,8 \text{ m h}^{-1}$ ). Depois disso, a biomassa sedimenta (duração: 3 min) e ocorre saída do efluente tratado (cerca de 40% do líquido do reactor) (duração: 5 min). Oxigénio dissolvido e pH são medidos online. O pH foi mantido a  $7.0 \pm 0.8$  por doseamento de NaOH 1 M ou 1 M de HCl. O biorreator foi operado à temperatura ambiente, cerca de  $25^\circ\text{C}$ . Os grânulos aeróbicos usados nas experiências de bioadsorção foram anteriormente expostos a diversos fármacos, incluindo fluoroquinolonas (Amorim 2014).

Os grânulos aeróbicos foram recolhidos durante a fase de arejamento de modo a obter uma amostra homogénea e representativa da população. Os grânulos húmidos foram pesados e usados para inocular uma solução de meio sintético suplementado com soluções de CPF de diferentes concentrações e incubadas a 120 rpm e à temperatura ambiente de cerca de  $25^\circ\text{C}$ . Ao longo do tempo, foram recolhidas amostras para análise. Após a conclusão de experiências de bioadsorção (48 h), foi determinado o peso seco da biomassa de acordo com o procedimento descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA 1998).

### **2.5.1. Estudos de bio sorção da CPF de acordo com a concentração do bio sorvente**

Para avaliar a concentração ótima de bio sorvente que permite alcançar uma maior capacidade de bio sorção foram adicionados 0.5, 1 e 2 g de grânulos húmidos a uma solução de CPF em meio sintético de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , num volume final de 50 mL. Os grânulos permaneceram em contacto com a solução de CPF durante 10 h, com agitação (120 rpm) e recolheram-se alíquotas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 10 h. A quantificação de CPF presente em cada amostra foi avaliada por HPLC-FD.

### **2.5.2. Estudos cinéticos de bio sorção da CPF a grânulos aeróbios ativos e inativos de acordo com as dimensões**

Para avaliar o efeito da dimensão dos grânulos na bio sorção de CPF, foram realizadas experiências de bio sorção para os grânulos aeróbios ativos e inativos de dimensões diferentes como se segue:

Grânulos aeróbios ativos: Os grânulos aeróbios produzidos no biorreator, foram recolhidos e separados usando tamises de calibre exato de acordo com as dimensões seguintes: menores de 1 mm e 1-2 mm. A morfologia dos grânulos foi avaliada com a ajuda de uma lupa (SZ30, Olympus, Japão) acoplada a uma máquina fotográfica digital (C-5060WZ, Olympus, Japão). Cerca de 1 g de grânulos húmidos de cada um dos tamanhos foi adicionado a 50 mL de meio sintético contendo  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de CPF. Foram retiradas alíquotas do sobrenadante nos tempos 0, 0.5, 1, 3, 6, 24 e 48 h. As alíquotas foram centrifugadas a 14000 rpm e o sobrenadante foi recolhido para determinação da concentração de CPF residual por HPLC-FD.

Grânulos aeróbios inativos (inativados pelo calor): os grânulos recolhidos do biorreator, foram secos na estufa a  $105^\circ\text{C}$  por 2 h e depois ressuspensos em água destilada com agitação durante 30 min. Os grânulos reidratados foram tamisados e separados de acordo com as dimensões seguintes: menores de 1 mm e 1-2 mm. Cerca de 0.5 g de grânulos húmidos de cada um dos tamanhos foram adicionados a 50 mL do meio sintético contendo  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de CPF. Foram retiradas alíquotas do sobrenadante nos tempos 0, 0.5, 1, 3, 6, 24 e 48 h.

As alíquotas foram centrifugadas a 14000 rpm e o sobrenadante foi recolhido para determinação da concentração de CPF residual por HPLC-FD. A Fig. 4 apresenta a morfologia dos grânulos aeróbios ativos e inativos.

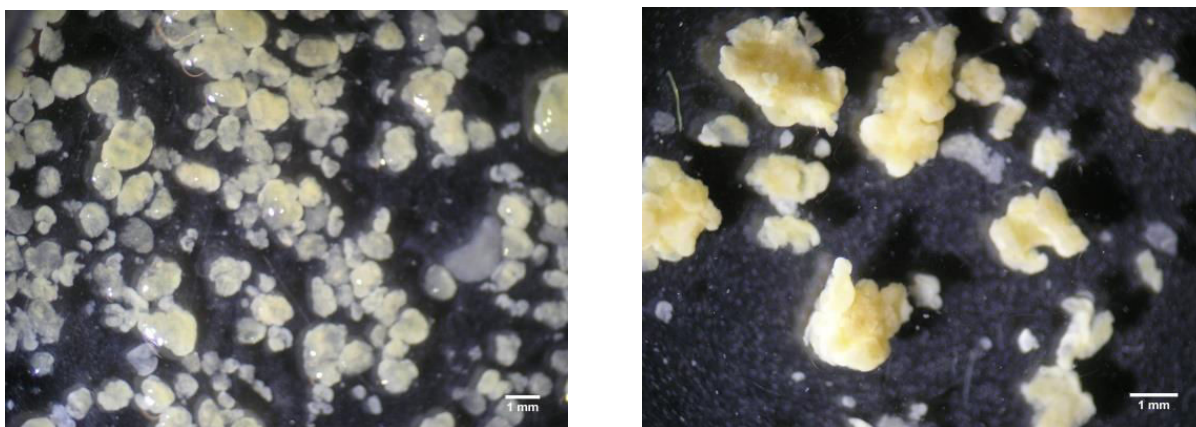


Fig. 4. Morfologia dos grânulos aeróbios ativos (esquerda) e inativos (direita).

Todas as experiências foram realizadas em duplicado. Os dados cinéticos de bioadsorção foram analisados usando modelos de Lagergren e Ho para a obtenção das constantes cinéticas. Com base nessas constantes, foram calculados os valores teóricos das isothermas e comparados com os valores experimentais.

### **2.5.3. Estudos das isothermas de equilíbrio de bioadsorção da CPF a grânulos aeróbios ativos à diferentes temperaturas**

Com vista a ter mais detalhes sobre os processos de bioadsorção da CPF na superfície dos grânulos aeróbios ativos, assim como entender os parâmetros termodinâmicos da bioadsorção foram realizadas experiências de equilíbrio de bioadsorção à diferentes temperaturas, como se segue:

Aproximadamente 1 g de grânulos aeróbios ativos foi adicionado a 50 mL de uma solução de meio sintético contendo as seguintes concentrações de CPF: 25, 50, 100, 200, 400 e 800  $\mu\text{g L}^{-1}$  à temperatura de 298 K (25°C). O mesmo procedimento foi usado mas a diferentes temperaturas de incubação: 285 K (12 °C), e 313 K (40 °C). Após 48 h de incubação a essas temperaturas foram colhidas amostras que foram centrifugadas a 14000 rpm. Recolheu-se o sobrenadante, acidificou-se com 5% de ácido acético até um pH de cerca de 2.4 e congelou-se até proceder à análise por HPLC-FD. O estudo das isothermas de equilíbrio de bioadsorção foi efetuado usando modelos de Langmuir e Freundlich que permitiram a obtenção de constantes isotérmicas. Com base nessas constantes foram calculados os valores teóricos das isothermas e comparados com os valores experimentais.

#### **2.5.4. Estudos dos mecanismos de interação da CPF com grânulos aeróbios pelo FTIR**

Com vista a compreender os mecanismos de interação da CPF com os grânulos aeróbios ativos foi feito um estudo FTIR, como se apresenta a seguir:

Cerca de 1 g de grânulos aeróbios ativos húmidos foi posto em contacto com uma solução de CPF a  $800 \mu\text{g L}^{-1}$  em meio sintético, à temperatura de  $25^\circ\text{C}$  e com agitação a 120 rpm por 24 h. Em simultâneo, cerca de 1 g de grânulos aeróbios ativos foi posto em contato com meio sintético sem CPF e tratado nas condições anteriores para servir de controlo negativo. Após 24 h, as suspensões foram centrifugadas e os sedimentos lavados com água destilada e liofilizados. As amostras foram preparadas misturando grânulos liofilizados, com e sem CPF, com KBr e foram obtidos espectros no IV.

### **3. Resultados e discussão**

#### **3.1. Optimização do HPLC-FD**

A utilização de uma coluna de fase reversa modificada da Phenomenex, com grupos pentafluorofenil ligados à superfície da sílica, permite maior selectividade aromática devido aos átomos eletronegativos de flúor em cada um dos anéis (Maia et al. 2014).

Os cromatogramas apresentados na Fig. 5 correspondem aos resultados obtidos nas condições optimizadas. Após ensaiar diversas variáveis cromatográficas, foram seleccionadas as seguintes condições de eluição finais para a análise da CPF: 55% A e 45% B (A: solução aquosa com 0.1% trietilamina acidificada com ácido trifluoroacético: pH=2; B: metanol) que deu um  $t_R=4.7$ . Os cromatogramas da Fig. 5 mostram a condição com 60% A e 40% B com menor tempo de retenção ( $t_R=4.0$  min), esta não foi escolhida pois o pico relativo à CPF apresentou-se muito próximo da frente do solvente. Uma vez que os grânulos aeróbios são constituídos por bactérias, existia a possibilidade de biodegradação, e para evitar que eventuais metabolitos coeluissem com a CPF, foi escolhida a condição 55% A e 45% B que deixa um espaço considerável entre a frente do solvente e o pico da CPF, como ilustra a Fig. 5. As condições descritas permitem a quantificação direta da CPF sem necessidade de preparações complexas das amostras e nem a procedimentos de extração e/ou pré concentração.

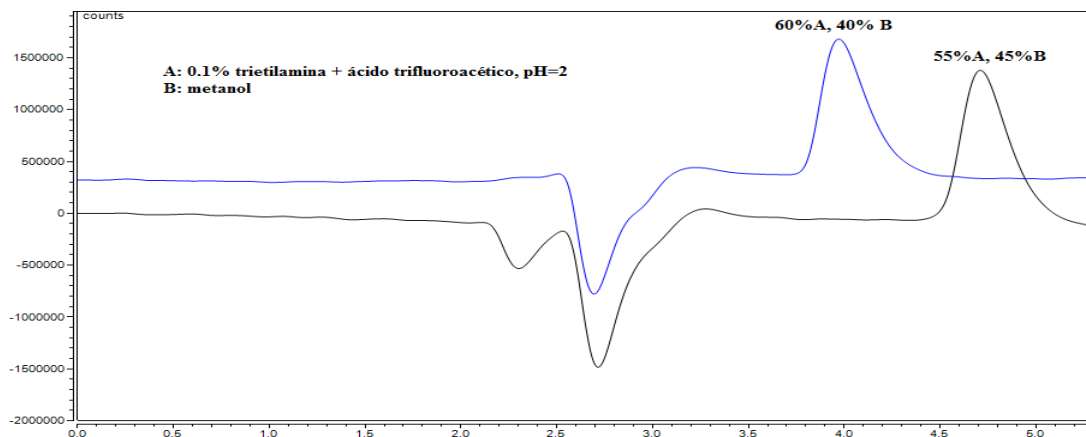


Fig. 5. Otimização das condições de eluição para a análise da CPF através do ajuste da percentagem dos componentes da fase móvel.

As amostras foram injetadas no cromatógrafo após centrifugação. Este método foi o usado para a análise do processo de biossorção da CPF em grânulos ativos e inativos.

### 3.2. Validação do método HPLC-FD

Os cromatogramas apresentados na Fig. 6 permitem aferir a seletividade do método cromatográfico utilizado. Da análise dos cromatogramas é possível verificar que os grânulos e outras substâncias não interferem com a determinação da CPF, o que indica que o método é seletivo.

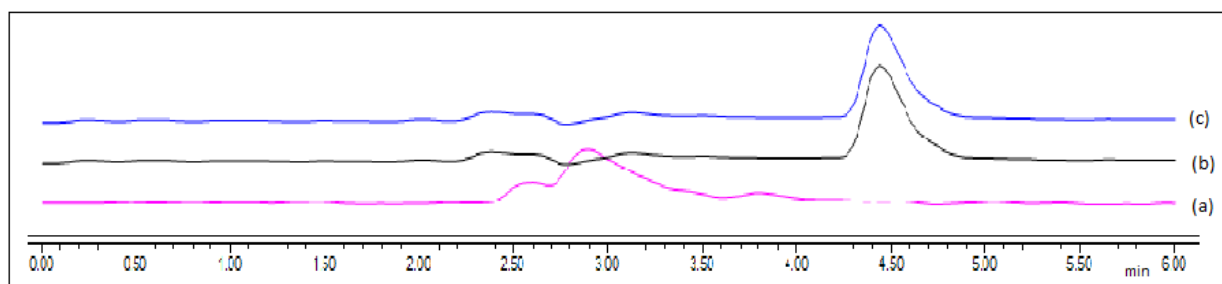


Fig. 6. Cromatogramas para a avaliação da seletividade do método; (a) suspensão de grânulos em meio sintético; (b) suspensão de grânulos em meio sintético suplementado com CPF, no  $t_0$ , e (c) solução de CPF em meio sintético (concentração da CPF:  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ )

Para avaliar a linearidade foi construída uma curva de calibração relacionando a área do pico da CPF em função da concentração, Fig. 7.

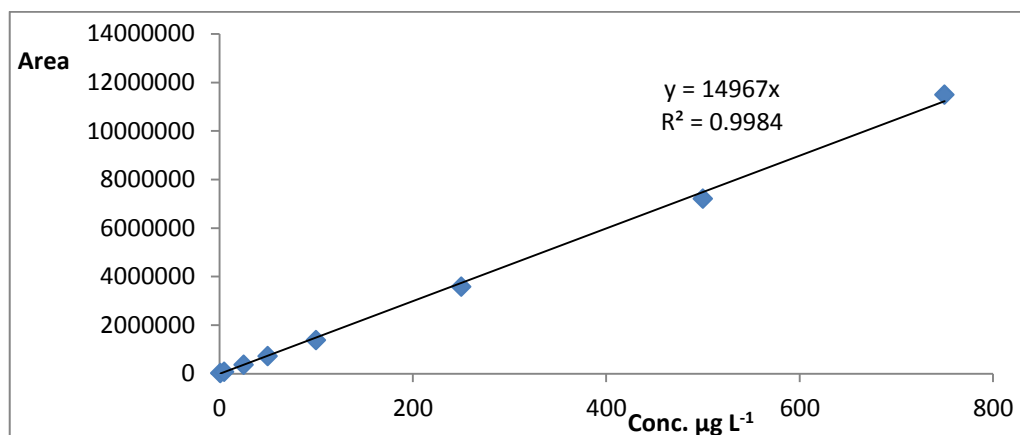


Fig. 7. Curva de calibração de 1 a 750  $\mu\text{g L}^{-1}$

A curva de calibração ( $n=8$ ) foi linear e reproduzível nas concentrações analisadas (de 1.0 a 750  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). O coeficiente de correlação,  $R^2$  foi de 0.9984. O intervalo ideal foi fixado entre 1 e 750  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A razão sinal ruído foi de 3:1 para estimar o LD e de 10:1 para estimar o LQ. O LD foi de 0.6  $\mu\text{g L}^{-1}$  e o LQ foi de 1.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros da curva de calibração, limites de detecção e quantificação

Analito	Regressão linear Intervalo ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ): [1-750]	CV (%)	$R^2$	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Ciprofloxacina	$y=14967x$	<1.7	0.9984	0.6	1.0

A exatidão e a precisão foram avaliadas analisando também os resultados obtidos com três concentrações diferentes de CPF (3, 375 e 560  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) analisadas em triplicado e em três dias consecutivos. Os valores obtidos para a exatidão estiveram no intervalo entre 92,6 e 105,3%. Para estimar a precisão do método, a repetibilidade (CV nos ensaios “intra-dia”) e a precisão intermediária (CV nos ensaios “inter-dia”) foram examinados e os CV calculadas nos ensaios intra e inter-dia foram inferiores a 2.51 e 2.74, respectivamente (Tabela 2). Tanto nos ensaios intra- e inter-dia a exatidão e a precisão estiveram dentro dos limites estabelecidos pelas diretrizes ICH 1996 e FDA 2001, onde a precisão e a exatidão encontradas em cada concentração não deve exceder 15% do CV e a exatidão deve estar no intervalo de 85 a 115%.

Tabela 2. Exatidão, precisão e ensaios inter e intradia

Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1º dia		2º dia		3º dia	
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)
3	100.3	2.0	99.1	3.1	100.9	5.5
375	97.6	0.9	96.2	0.9	97.2	0.6
560	98.2	4.0	101.3	3.7	99.8	3.8

### 3.3. Estudos cinéticos do processo de biossorção

A cinética de biossorção demonstra a velocidade de ligação de solutos sobre a superfície dos materiais biológicos. As experiências cinéticas do processo de biossorção são amplamente estudadas, a fim de determinar o tempo de contacto requerido para atingir o equilíbrio de sorção e para avaliar o impacto do tamanho das partículas sobre os parâmetros dos modelos cinéticos que são úteis para avaliar as propriedades de biossorção de um dado biossorvente (Michalak et al. 2013). A quantidade de sorção  $q_t$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ), no instante  $t$  e no equilíbrio, é calculada usando as seguintes equações (Kumar et al. 2013):

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t)V}{M} \quad (1)$$

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{M} \quad (1')$$

onde:

$q_t$  e  $q_e$  são as capacidades de adsorção, no tempo  $t$  e no equilíbrio, respectivamente, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ ,

$C_0$ ,  $C_t$  e  $C_e$  são as concentrações do composto na fase líquida, no início  $t_0$ , no tempo  $t$ , e no equilíbrio, respectivamente, em  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,

$M$  é massa total do biossorvente (peso seco), em g;

$V$  é o volume total da solução do composto no frasco, em L.

A percentagem de CPF removida (%R) no equilíbrio (Kumar et al. 2013, Meneghel et al. 2013) é dada por:

$$\%R = \frac{(C_0 - C_e)}{C_0} * 100 \quad (2)$$



### 3.3.1. Efeito da concentração do bioissorvente no processo de bioissorção

O efeito da concentração do bioissorvente na remoção da CPF é apresentado na Fig. 8. A quantidade de CPF removida pelos grânulos aumenta com o aumento da concentração de bioissorvente. Assim, a remoção é maior quando se utilizaram 2 g de grânulos (33.7%) do que quando se utilizaram 1 g (28.7%) ou 0.5 g (19.3%). Estes resultados não são surpreendentes, uma vez que quanto maior a concentração de bioissorvente maior a probabilidade de ocorrerem interações entre a CPF e o bioissorvente. Aumentando a concentração da biomassa, aumenta o número de locais disponíveis para a bioissorção. A capacidade de remoção aumenta até às 4 h para todas as concentrações de bioissorvente estudadas, estabilizando entre as 4 h e as 6 h e diminui significativamente entre as 6 h e as 10 h. Ao fim de 10 h a concentração de CPF no meio é praticamente a mesma quando se usa 0.5 g ou 1 g de grânulos.

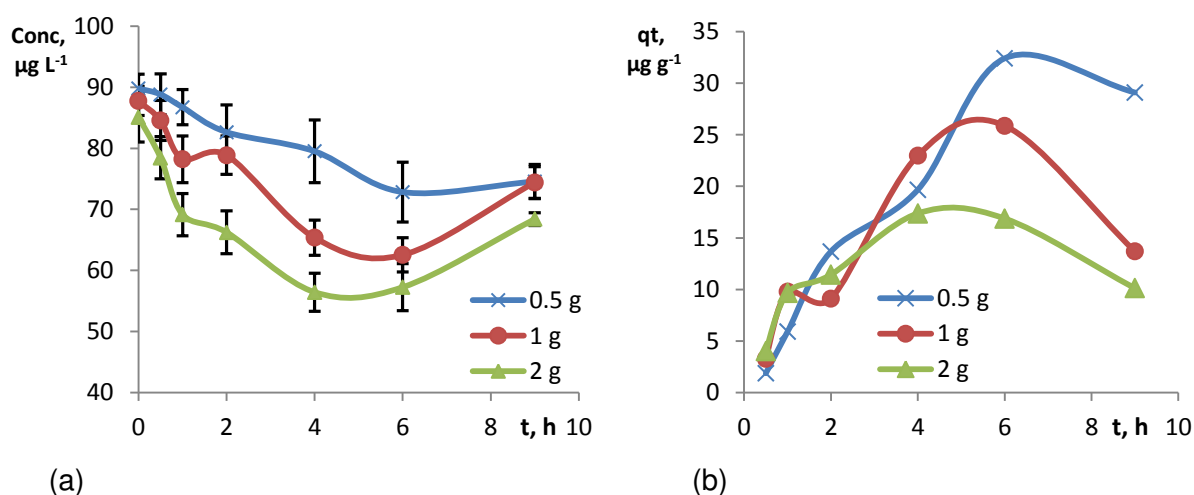


Fig. 8. Efeito da concentração de bioissorvente; (a) quantidade de CPF presente ao longo do tempo; (b) quantidade de CPF adsorvida ao longo do tempo.

O gráfico da Fig. 8(b) mostra um efeito contrário quando se trata da capacidade de bioissorção. Quanto menor for a concentração do bioissorvente, maior é a capacidade de bioissorção, no equilíbrio ( $q_{t(0.5\text{ g})}=32.4\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$   $q_{t(1.0\text{ g})}=25.9\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$   $q_{t(2.0\text{ g})}=16.9\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ ). Este efeito indica que embora seja maior a concentração da CPF removida da solução quando se usa uma maior concentração da biomassa (Fig. 8 a), estes grânulos não permitem a remoção de grandes quantidades do composto. Por outras palavras, há mais quantidade da substância

(por grama de grânulos), quando é usada uma massa menor do que quando se usa uma massa maior.

### 3.3.2. Efeito das dimensões dos grânulos no processo de biossorção

A Fig. 9 (a), mostra a remoção da CPF ao longo do tempo e os grânulos ativos de menores dimensões (<1 mm) possuem maior capacidade de remoção da CPF (44.6%) do que os grânulos de maiores dimensões (1-2 mm) (36.9%). A partir do gráfico que relaciona a capacidade de biossorção com o tempo, Fig. 9 b) é possível se observar que os grânulos de menor tamanho tem maior capacidade de biossorção.

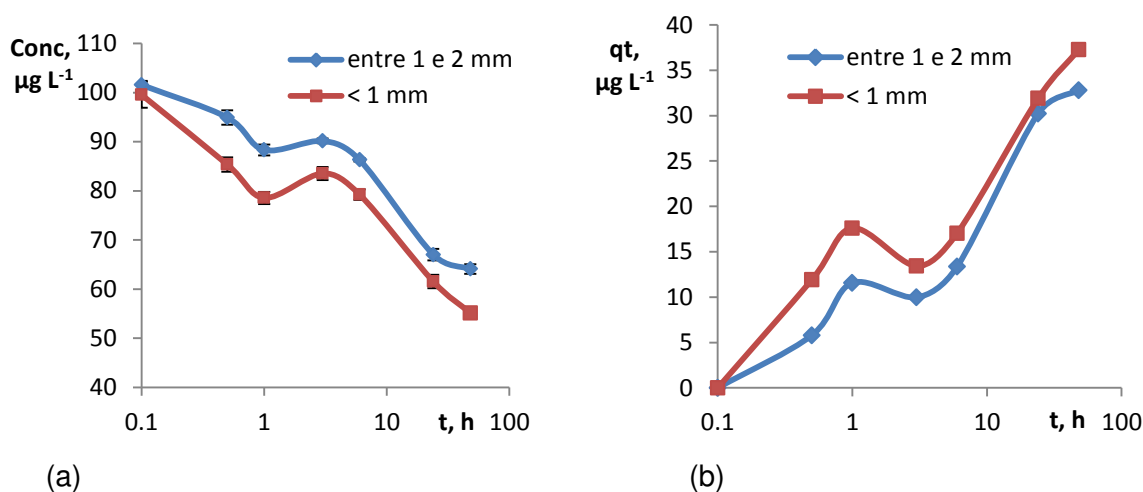


Fig. 9. Efeito do tamanho dos grânulos aeróbios ativos na biossorção (a) concentração da CPF presente ao longo do tempo; (b) capacidade de biossorção (qt) ao longo do tempo t.

A Fig. 9 ilustra também que entre a 1 h e as 3 h se verifica um fenómeno de desadsorção da CPF dos grânulos ativos de ambas as dimensões. Esta tendência de desadsorção desaparece após as 3 h, continuando então a observar-se adsorção da CPF até as 48h. Este ciclo de adsorção/desadsorção/adsorção já tinha sido anteriormente observado e comentado no ensaio anterior (Fig. 8). Uma vez que os grânulos aeróbios ativos possuem EPS que são polímeros de macromoléculas orgânicas secretadas por microrganismos (principalmente bactérias), sob certas condições ambientais, que formam uma matriz tridimensional (Gao et al. 2011) existe a possibilidade de que uma parte das moléculas da CPF tenha sido adsorvida e outra parte ter simplesmente encalhado na estrutura do EPS (com estrutura obviamente mais desorganizada devido as cadeias longas dos componentes do EPS) no

intervalo de 0 a 1 h. Esta sugestão é acompanhada pelo fato de no tempo entre 1 a 3 h haver um ligeiro aumento da concentração da CPF que pressupõe a libertação das moléculas encalhadas (não adsorvidas). Após as 3 h existe adsorção até as 48 h. Isto pode indicar a influência do tempo de contacto, que faz com que haja maior interação entre os grânulos e o composto.

O estudo realizado em simultâneo, para os grânulos inativos (Fig. 10), apresenta um comportamento diferente dos grânulos ativos. Os grânulos ativos mostram uma tendência de bioadsorção constante da CPF ao longo do tempo até ao equilíbrio (Fig. 10 a). Este fenómeno pode ter acontecido devido ao aquecimento a 105 °C que alterou a estrutura dos grânulos e poderá ter compactado o EPS (o que é provável pela presença de cerca de 50% de polissacáridos no EPS (Gao et al. 2011), e que os grânulos ficaram na forma de caramelo com o aquecimento, o que terá causado uma adsorção constante da CPF. Gao et al. 2010 foi o primeiro trabalho a reportar sobre a adsorção de um corante em grânulos aeróbios inativos mas informação sobre a estrutura dos grânulos e EPS após inativação a 105 °C não foi reportada na literatura.

Observa-se também que os grânulos inativos <1 mm adsorvem mais do  $t_0$  até as 3h e que os grânulos com o tamanho entre 1-2 mm começaram a adsorver mais do que os anteriores depois das 3 h. O máximo de bioadsorção é alcançado após 6 h nos grânulos inativos <1 mm e após 24 h nos grânulos inativos com o tamanho entre 1-2 mm. Os grânulos inativos com o tamanho entre 1-2 mm removem mais CPF (34.9%) em relação aos grânulos com o tamanho <1 mm (28.6%) nos seus tempos máximos de adsorção. Durante a experiência observou-se que após a inativação os grânulos formaram agregados granulares o que pode ter influenciado a esta tendência. É difícil tirar ilações deste estudo porque não houve continuidade dos estudos de bioadsorção com os grânulos inativos tal como aconteceu aos ativos. Tais estudos poderiam ter fornecido mais informação sobre o processo de bioadsorção após a inativação.

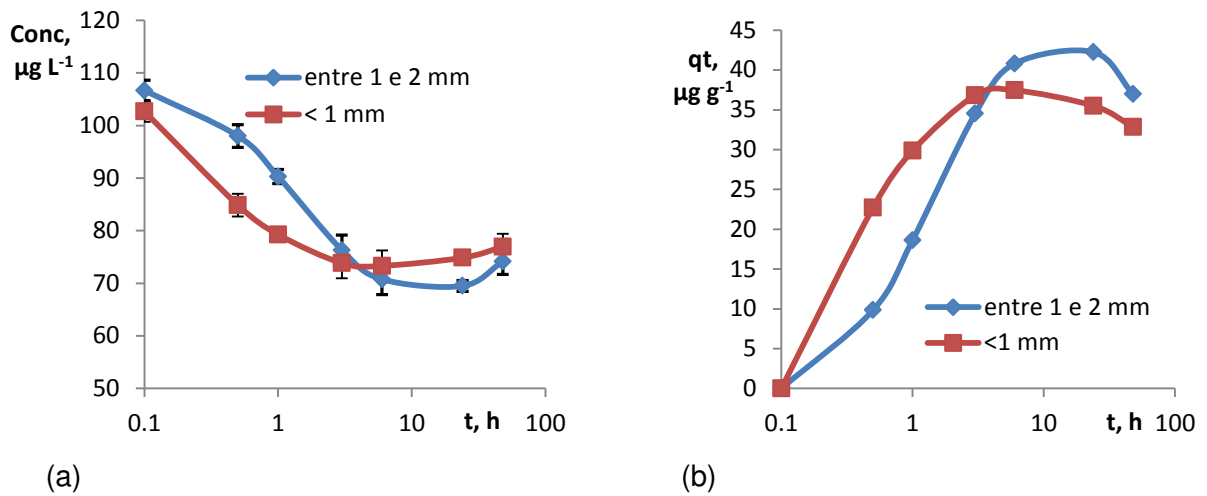


Fig. 10. Efeito do tamanho dos grânulos inativos na biossorção (a) concentração da CPF presente ao longo do tempo; (b) capacidade de biossorção ( $q_t$ ) ao longo do tempo  $t$ .

Para avaliar a cinética de biossorção, são usados vários modelos cinéticos disponíveis na literatura. Os modelos com base na ordem da reação química são de interesse particular, especialmente os modelos de Lagergren (1933) (pseudo primeira ordem) (Eq. 3) e Ho (1999) (pseudo segunda ordem) (Eq. 4). O modelo de cinética de pseudo primeira ordem assume que o processo de adsorção depende apenas do número de moléculas presentes em solução a um tempo específico enquanto que o modelo de pseudo-segunda ordem assume que a biossorção depende do número de moléculas presentes na solução e dos locais de ligação disponíveis no adsorvente (Saini e Melo 2013, Michalak et al. 2013, Wang et al. 2013). A equação linear do modelo de pseudo primeira ordem é apresentada abaixo:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (3)$$

onde:

$q_e$  quantidade do composto biosorvida na biomassa no equilíbrio ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ),

$q_t$  quantidade do composto biosorvida na biomassa num dado tempo ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

$k_1$  constante de biossorção da pseudo primeira ordem ( $\text{h}^{-1}$ )

O modelo é geralmente escolhido em função do valor do coeficiente de determinação, isto é, modelos com maior  $R^2$  são escolhidos. No entanto, não apenas o elevado de  $R^2$  importa, mas também, os valores previstos de  $q_e$  devem se aproximar aos valores experimentais de  $q_e$  para sugerir que o processo de biossorção segue uma cinética de primeira ordem (Patel

and Suresh 2008). De acordo com a Eq. 3, o declive e a intersecção da reta  $\ln(q_e - q_t)$  versus  $t$  produz os valores de  $k_1$  e  $\ln q_{m\acute{a}x}$ , respectivamente. Caso este modelo não seja adequado, tenta-se ajustar os dados de biosorção em modelo cinético de pseudo segunda ordem, apresentado abaixo:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{h} + \frac{1}{q_{max}} t \quad (4)$$

onde,

$h = k_2 q_{m\acute{a}x}^2$  é a taxa de biosorção específica em ( $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ );

$k_2$  é a constante de biosorção de pseudo segunda ordem ( $\text{g } \mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ).

Com base na Eq. 4 os valores de  $k_2$  e  $q_e$  podem ser determinados a partir da intersecção e inclinação, respectivamente, de um gráfico linear  $\frac{t}{q_t}$  vs  $t$ . A tabela 1 apresenta os valores de  $k_1$ ,  $h$ ,  $k_2$ , assim como os valores de  $q_{exp}$  e  $q_{calc}$  para na biosorção de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de CPF em grânulos aeróbios ativos. Os gráficos de pseudo primeira ordem e pseudo segunda ordem estão apresentados no anexo I e II, respetivamente, para os grânulos ativos e inativos.

Tabela 3. Comparação das constantes cinéticas da biosorção da CPF para diferentes dimensões

Dimensão (mm)		Pseudo primeira ordem			Pseudo segunda ordem			
	$q_{exp.}$ $\mu\text{g g}^{-1}$	$k_1,$ $\text{h}^{-1}$	$q_{calc.}$ $\mu\text{g g}^{-1}$	$R^2$	$k_2,$ $\text{g } \mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$	$h,$ $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$	$q_{calc.}$ $\mu\text{g g}^{-1}$	$R^2$
<b>ativos</b>								
<1	37.25	0.07	30.95	0.97	0.26	9.61	39.37	1
entre 1 - 2	32.79	0.10	31.81	0.99	0.20	6.59	36.36	1
<b>inativos</b>								
<1	35.50	1.32	31.75	0.99	0.61	37.17	44.64	0.98
entre 1 - 2	42.24	0.56	42.22	1	1.69	71.43	35.71	0.97

A tabela 3 mostra que os grânulos ativos das dimensões <1 mm os valores de  $q_{exp.}$  são próximos dos valores de  $q_{calc}$  usando uma cinética de primeira ordem. Os grânulos ativos das dimensões entre 1 – 2 mm os valores para de  $q_{exp.}$  são próximos dos valores de  $q_{calc}$  para usando uma cinética de segunda ordem. Os coeficientes de correlação são próximos da unidade. Apesar de o modelo cinético seguido pelos grânulos ativos com as dimensões <1 mm e entre 1 – 2 mm parecer diferente, os valores de  $q_{exp.}$  e  $q_{calc.}$  não são muito distantes

entre eles em ambos casos para sugerir que haja diferença no modelo seguido. Esta constatação sugere que os grânulos ativos partilham os dois modelos cinéticos (primeira e segunda ordem). Por outras palavras, a adsorção da CPF nos grânulos aeróbios ativos sugere uma dependência do estado actual da concentração da CPF assim como do número de sítios disponíveis para a ligação. Amorim et al. 2014 observou a adsorção de CPF e outras fluoroquinolonas a grânulos aeróbios mas estudos de adsorção não foram apresentados e não existem mais estudos na literatura sobre biossorção de CPF ou outros fármacos à grânulos aeróbios para motivos comparativos.

Para os grânulos inativos os valores de  $q_{exp}$  são próximos dos valores de  $q_{calc}$  para o modelo de pseudo primeira e os coeficientes de correlação são próximos da unidade, sugerindo que este modelo descreve melhor o processo de biossorção da CPF em grânulos inativos. Estes resultados são contrários aos resultados encontrados por (Gao et al. 2010) nos estudos de biossorção de um corante em grânulos aeróbios inativos.

As constantes de pseudo primeira e segunda ordem ( $k_1$  e  $k_2$ ) são geralmente maiores para os grânulos inativos, o que indica que a ligação da CPF aos grânulos inativos ocorre mais rapidamente do que nos grânulos ativos. Nota-se também que a capacidade de biossorção específica ( $h$ ) é maior para os grânulos inativos do que para os grânulos ativos.

### 3.3.3. Modelo de difusão intrapartícula de Weber e Morris

Para elucidar o mecanismo de difusão, os dados cinéticos foram analisados pelo modelo de difusão intra-partícula de Weber e Morris (1963). Este modelo é expresso pela seguinte equação (Yang et al. 2011, Wang et al. 2013):

$$q_t = k_p t^{\frac{1}{2}} - C \quad (5)$$

onde:

$k_p$  é a constante da taxa de difusão intrapartícula ( $\mu\text{g/g h}^{1/2}$ );

$C$  é uma constante (intersecção) relacionada com a espessura da camada fronteira, em  $\mu\text{g/g}$ , que é determinada pelo gráfico  $q_t$  vs  $t^{\frac{1}{2}}$  (Suriyanon et al. 2013). Quanto maior for o  $C$ , maior será o efeito da camada fronteira

De acordo com este modelo, se o gráfico de  $q_t$  vs  $t^{\frac{1}{2}}$  der uma linha reta que passa pela origem, então o processo de adsorção é controlado por difusão intra-partícula, enquanto que, se os dados apresentam etapas multi-lineares, dois ou mais passos influenciam o processo de adsorção (Reddy, Seshaiiah et al. 2012). No presente estudo, os dados apresentados na Tabela 4 e gráficos no anexo III, mostram que os grânulos aeróbios ativos seguem o modelo de difusão intrapartícula ( $R^2=0.95$  e  $0.96$ ), mas as retas não passam da origem ( $C=4.46$  e  $1.59$ ) o que sugere que a camada fronteira exerce um efeito no processo de biosorção.

Tabela 4. Parâmetros do modelo de difusão de Webb e Morris para os granulos ativos e inativos

Dimensão (mm)	Difusão intra-partícula		
	$k_p$ , $\mu\text{g/g h}^{1/2}$	$C$ , em $\mu\text{g/g}$ ,	$R^2$
<i>ativos</i>			
<1	5.07	4.46	0.95
1 a 2	4.94	1.59	0.96
<i>inativos</i>			
<1	30.28	0.29	1
1 a 2	17.73	-0.61	0.96

Os grânulos aeróbios inativos apresentam multi-linearidade, indicando pelo menos dois passos no processo de biosorção: uma primeira porção linear em que a etapa limitante da velocidade da reação é controlada por difusão intrapartícula ( $R^2=1$  e  $0.96$  e  $C=0.29$  e  $-0.61$ ), e uma segunda porção atribuída à etapa final de equilíbrio, onde a difusão intra-partícula começa a desacelerar devido à diminuição da concentração da CPF na solução. Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Gao et al. 2010. Na Tabela 4, observa-se também que os valores de  $k_p$  dos grânulos inativos são maiores do que os dos grânulos ativos, indicando maior taxa de difusão dos grânulos inativos. Este comportamento dos valores de  $k_p$  pode ser explicado pelo fato de nos grânulos inativos, a membrana citoplasmática estar ausente, o que poderá ter resultado na redução da difusão da CPF na camada fronteira e melhoraria da difusão no sólido (Yeddou-Mezenner 2010).

### 3.4. Isotermas de adsorção no equilíbrio

A isoterma representa a relação entre a capacidade de adsorção de uma substância à uma temperatura constante e a concentração da fase líquida, no equilíbrio (Gao et al. 2010). Em

geral, o tempo de contacto ótimo, e o tamanho ótimo das partículas avaliado a partir dos ensaios cinéticos é usado para realizar estes estudos (Michalak et al. 2013). A biossorção de CPF por grânulos aeróbios foi estudada em concentrações iniciais de CPF de 25, 50, 100, 200, 400 e 800  $\mu\text{g L}^{-1}$ , a três temperaturas (285 K, 298 K e 313 K) e os resultados são apresentados na Fig. 11.

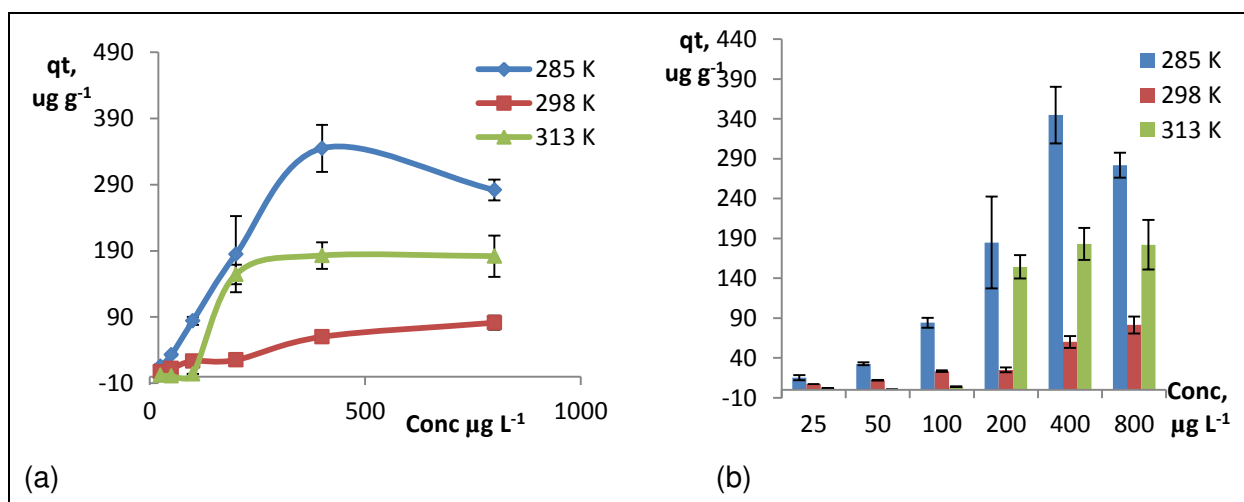


Fig. 11. Efeito da concentração inicial da CPF na biossorção às temperaturas 285 K, 298 K e 313 K; ( $C_0 = 25\text{--}800 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $m = 0.75 \text{ g L}^{-1}$ , peso seco,  $V = 50 \text{ mL}$ ,  $\text{pH} = 6.8$ )

Da Fig. 11. observa-se que há no geral um aumento da capacidade de biossorção com a concentração, nas três temperaturas estudadas. À 285 K a capacidade de biossorção máxima ( $q_{\text{máx}}$ ) foi de  $344.93 \mu\text{g g}^{-1}$  enquanto que para 298 K e 313 K o  $q_{\text{máx}}$  foi de 81.35 e  $183.00 \mu\text{g g}^{-1}$  respetivamente. Notou-se também um aumento na capacidade de biossorção dos grânulos aeróbios com o aumento da concentração inicial de CPF de 25 para  $400 \mu\text{g L}^{-1}$ . O aumento da concentração da CPF na solução eleva a probabilidade de colisões entre a CPF e os grânulos e assim diminui a resistência à transferência de massa. Pode prever-se o caráter exotérmico do processo porém, a 298 K, a capacidade de biossorção no intervalo de 25 a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  é maior do que a 313 K. Além disso, no intervalo de 200 a  $800 \mu\text{g L}^{-1}$  a capacidade de biossorção a 313 K foi maior que a 285 K. Os estudos dos modelos de equilíbrio de biossorção e estudos termodinâmicos, secção 3.4.1 e 3.4.2 podem dar mais detalhes sobre os comportamentos apresentados.



### 3.4.1. Modelos de equilíbrio de biosorção

Para avaliar a aplicabilidade do processo de sorção, é importante estabelecer o modelo mais adequado para a isoterma. Entre os vários modelos disponíveis na literatura, as isotermas mais usadas são as de Langmuir e Freundlich.

- Isotherma de Langmuir

A isoterma de Langmuir assume que a biossorção ocorre em locais homogêneos específicos na superfície do adsorvente, ou seja, uma vez que uma molécula ocupa um local de ligação, não havendo possibilidade de ocorrer biossorção de uma outra molécula nesse mesmo local. A forma não linear do modelo da isoterma de Langmuir é expressa pela seguinte equação (Yang et al. 2011):

$$q_e = bq_{m\acute{a}x} \frac{bC_e}{1 + bC_e} \quad (6)$$

A forma linear do modelo de isoterma de Langmuir

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{bq_{m\acute{a}x}} + \frac{C_e}{q_{m\acute{a}x}} \quad (6')$$

onde:

$C_e$  é a concentração do composto na solução no equilíbrio ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ),

$q_e$  é quantidade do composto biossorvida na biomassa no equilíbrio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )

$q_{m\acute{a}x}$  é a capacidade de biossorção máxima ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e,

$b$  é a constante de Langmuir (relacionada com a afinidade da substancia para o biossorvente) ( $\text{L } \mu\text{g}^{-1}$ )

Os valores experimentais foram analisados usando o modelo linear (Eq. 6') de modo a obter as constantes de Langmuir ( $q_{m\acute{a}x}$  e  $b$ ) a partir do declive  $\frac{1}{q_{m\acute{a}x}}$  e interseção  $\frac{1}{bq_{m\acute{a}x}}$  do gráfico  $\frac{C_e}{q_e}$  vs  $C_e$ . Estas constantes são posteriormente substituídos no modelo não linear, para calcular os valores de  $q_e$  teóricos (Patel and Suresh 2008).

O fator de separação  $R_L$  é outra constante adimensional que define se o processo de sorção é favorável ou desfavorável (Yang et al. 2011, Saini & Melo 2013).

$$R_L = \frac{1}{1 + bC_0} \quad (7)$$

onde:

$b$  é a constante de Langmuir ( $L \mu g^{-1}$ )

$C_0$  é a concentração inicial do composto ( $\mu g L^{-1}$ )

O valor de  $R_L > 1$  sugere que o processo de sorção é desfavorável,  $R_L = 1$  é linear,  $0 < R_L < 1$  é favorável e  $R_L = 0$  indica que o processo é irreversível. No presente estudo os valores de  $R_L$  encontravam-se na gama de 0 a 1, indicando que a bio-sorção da CPF é favorável (Saini and Melo 2013). Os valores de  $RL$  encontrados estiveram entre 0 e 1 nas CPF concentração inicial de 25, 50, 100, 200, 400 e 800  $\mu g L^{-1}$ , nos casos em que o modelo de Langmuir foi observado (Fig. 12) mostrando que a adsorção da CPF aos grânulos aeróbios foi favorável.

- Isoterma de Freundlich

A isoterma de Freundlich (Freundlich, 1906) é válida para bio-sorção em multi-camadas numa superfície heterogénea do adsorvente e, baseia-se no pressuposto de que diferentes sítios possuem diferentes energias de adsorção. A forma não linear da equação da isoterma de Freundlich é a seguinte:

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad (8)$$

A forma linear deste modelo é a seguinte:

$$\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (8')$$

onde:

$K_F$  ( $L g^{-1}$ ) é a capacidade de bio-sorção (indica a extensão da bio-sorção).

$n$  (adimensional), é intensidade de biosorção (indica o grau de não linearidade entre a concentração da solução e a biossorção (Yang et al. 2011).

Os valores experimentais foram analisados usando o modelo linear (Eq. 8') de modo a obter as constantes de Freundlich ( $K_F$  e  $n$ ) a partir da interseção  $\ln K_F$  e do declive  $\frac{1}{n}$  do gráfico  $\ln q_e$  vs  $\ln C_e$ . Estas constantes são posteriormente substituídas no modelo não linear (Eq. 8), para calcular os valores de  $q_e$  teóricos (Patel e Suresh 2008). A comparação dos perfis teóricos e experimentais da biossorção da CPF em grânulos aeróbios ativos às temperaturas de 285 K, 298 K e 313 K é apresentada na Fig. 12. Os gráficos dos modelos lineares são apresentados nos anexos IV, V e VI para as temperaturas de 285 K, 298 K e 313 K respetivamente. Os dados foram compilados na Tabela 5.

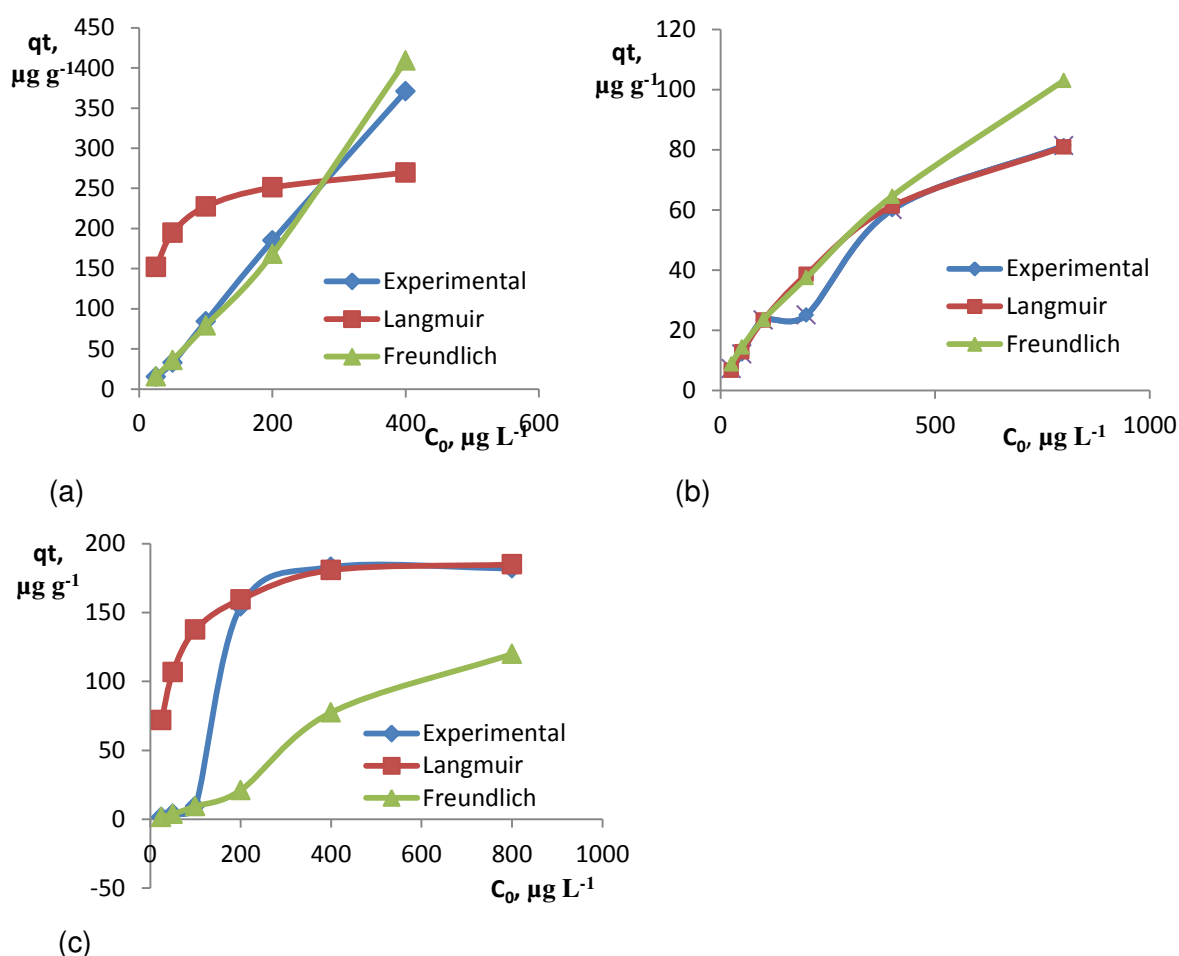


Fig. 12. Comparação entre isotermas experimental e teórica (Langmuir e Freundlich) para biossorção de CPF em grânulos aeróbios. (a) 285 K; (b) 298 K e (c) 313 K. Condições de biossorção: pH 6.8, peso de biomassa seca =  $0,75 \pm 0,05$  g em 50 mL, 120 rpm, 48 h.

A análise dos perfis experimentais e teóricos a 285 K (Fig. 12 a) revelou que o modelo de Freundlich foi o mais apropriado para a previsão dos perfis isotérmicos. A 298 K (Fig. 12 b), o modelo de Langmuir mostrou-se mais apropriado em toda gama de concentrações estudada, mas o modelo de Freundlich também foi apropriado processo até aos 400  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Esta observação sugere que o processo de bioadsorção da CPF a esta temperatura ocorre na superfície homogênea dos grânulos. À 313 K pode ser observado da Fig. 12 (c) que o modelo de Freundlich foi o mais apropriado ao intervalo mais baixo de concentrações (25 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) enquanto que o modelo Langmuir foi o mais apropriado de 200 a 800  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Esta observação sugere que o processo de sorção ocorre na superfície heterogênea a baixas concentrações mas o aumento da concentração teria provocado uma homogeneidade na superfície dos grânulos que poderá ter ditado a mudança no modelo de bioadsorção. Para motivos comparativos, não são encontrados na literatura estudos sobre adsorção de fármacos em grânulos aeróbios ativos. (Patel & Suresh 2008) no estudo da bioadsorção de um corante à fungos, notou que o modelo de Freundlich se encaixava bem na zona de concentrações mais baixa e a todas as temperaturas estudadas.

Tabela. 5. Constantes isotérmicas de Langmuir e Freundlich para a bioadsorção de CPF em grânulos aeróbios à temperaturas variadas.

Temperatura (K)	Constantes de Langmuir				Constantes de Freundlich		
	$q_{exp.}, \mu\text{g g}^{-1}$	$q_{máx}, \mu\text{g g}^{-1}$	$b \times 10^{-3}, \text{L } \mu\text{g}^{-1}$	$R^2$	$n$	$K_F, \mu\text{g g}^{-1}$	$R^2$
285	370.92	269.50	2.51	0.44	1.41	1.982	0.99
298	81.35	80.94	5,42	0.99	1.44	1.277	0.99
313 (a) (b)	----	----	----	----	0.76	0.045	1
	183.00	184.16	37,01	1	----	----	----

(a) 25-100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (b) 200-800  $\mu\text{g L}^{-1}$

Como pode se ver na Tabela 5, o valor de  $K_F$  diminuiu com o aumento da temperatura de 285 K a 313 K (de 1.982 a 0.045), o que indica uma diminuição da afinidade da CPF para os grânulos aeróbios (Michalak et al. 2013). O valor da constante de Langmuir  $b$  também aumentou com a temperatura o que sugere que as moléculas de CPF exibiram maior afinidade para a biomassa a baixas temperaturas do que a temperatura mais alta. Os valores de  $n$  superiores à unidade a 285 e 298 K indicam que o processo é favorável enquanto que a 313 K, para concentrações de 25 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  indica que a bioadsorção de CPF neste intervalo foi desfavorável.

### 3.4.2. Análise termodinâmica dos dados de biosorção isotérmica

Os parâmetros termodinâmicos dos dados de biosorção da CPF em grânulos aeróbicos tais como a variação de entalpia  $\Delta H^0$ , a variação de entropia ( $\Delta S^0$ ) e a variação da energia livre de Gibbs  $\Delta G^0$ , foram determinados pela Eq. (9) e pela Eq. (10). As constantes de equilíbrio ( $K_c$ ) foram calculadas a partir da interseção do gráfico de Khan e Singh ( $\ln q_e/C_e \times q_e$ ), ou a partir da inclinação do gráfico  $q_e$  vs  $C_e$  (Sawalha et al. 2006) para as temperaturas de 285 K, 298 K e 313 K respectivamente, ver anexos VII, VIII e IV.

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_c \quad (9)$$

$$\ln K_c = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT} \quad (10)$$

onde,

$\Delta G^0$  variação da energia molar de Gibbs ( $\text{J mol}^{-1}$ )

$R$  constante universal dos gases ( $8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )

$T$  temperatura (K)

$\Delta H^0$  variação da entalpia molar ( $\text{J mol}^{-1}$ )

$\Delta S^0$  variação da entropia molar ( $\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )

$K_c$  constante de equilíbrio de ( $\text{L g}^{-1}$ , todavia para o cálculo de  $\Delta G^0$ , o  $K_c$  deve ser multiplicado por 1000 de modo que seja adimensional).

Os valores de  $\Delta G^0$  a diferentes temperaturas estão listadas na Tabela 6. Os valores de  $\Delta H^0$  e  $\Delta S^0$  para o processo de biosorção foram obtidos a partir do declive e ordenada na origem do gráfico  $\ln K_c$  vs  $1/T$  apresentado no anexo X.

Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos para a biosorção de CPF em grânulos aeróbicos

Temperatura (K)	Khan e Singh			$q_e$ vs $C_e$ plot		
	$K_c, \text{L g}^{-1}$	$R^2$	$\Delta G^0, \text{kJ mol}^{-1}$	$K_c, \text{L g}^{-1}$	$R^2$	$\Delta G^0, \text{kJ mol}^{-1}$
285	1.1443	0.92	-16.69	2.9026	1	-18.89
298	0.4792	0.99	-15.29	0.1939	0.95	-12.23
313 (a)	0.0988	0.92	-11.95	0.1754	1	-13.45
(b)	306.49	0.90	-32.87	0.0957	0.83	-11.87

(a) 25-100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (b) 200-800  $\mu\text{g L}^{-1}$

Como pode ser visto a partir da Tabela 6, os valores de  $\Delta G^0$  foram de -18.89, -12.23 e -13.45 kJ mol<sup>-1</sup> a 285, 298 e 313 K (a) respectivamente. Os valores de  $\Delta H^0$  e  $\Delta S^0$  foram de -73.14 e -0.20 kJ mol<sup>-1</sup>. Os valores de  $\Delta G^0$  e  $\Delta H^0$  foram negativos para todas as temperaturas estudadas, indicando que o processo de bioadsorção foi espontâneo e exotérmico, o que foi consistente com as observações experimentais. O valor negativo pequeno de  $\Delta S^0$  mostra uma pequena diminuição da desordem na interface entre o sólido e líquido durante a bioadsorção. Observações semelhantes também foram reportadas por Gao et al. 2010. O fato a  $\Delta H^0$  ter sido inferior a -40 kJ mol<sup>-1</sup> sugere um processo de quimisorção (Onal et al. 2007, Antunes et al. 2012).

### **3.5. Avaliação dos mecanismos de interação da CPF com os grânulos aeróbios ativos por FTIR**

Com vista a esclarecer os tipos de interação que ocorrem durante a bioadsorção da CPF com os grânulos aeróbios, procedeu-se a um estudo FTIR. Para isso registaram-se e compararam-se espectros de absorção no IV (FTIR) de amostras de grânulos aeróbios ativos isentos de CPF com espectros no IV (FTIR) de amostras de grânulos aeróbios ativos que estiveram em contacto com CPF (800 µg L<sup>-1</sup>). O FTIR oferece informações importantes relacionadas com a natureza das ligações e permite a identificação de diferentes grupos funcionais na estrutura da parede celular. A extensão do desvio da banda de absorção antes e depois da bioadsorção da CPF poderá indicar o grau e o tipo de interação dos grupos funcionais com o composto.

É conhecido que quando se verificam ligações entre duas moléculas, nomeadamente ligações de hidrogénio, iónicas, de van der Waals ou outras, isso se reflete no processo de absorção de radiações no IV (Kumar et al. 2013). Por exemplo, um grupo hidroxilo livre absorverá de forma diferente, apresentará diferentes máximos e diferentes intensidades de absorção, em relação a um grupo hidroxilo comprometido numa ligação. Comparando os espectros dos grânulos aeróbios ativos sem e com CPF foi possível encontrar algumas diferenças entre eles, o que evidencia o fenómeno de bioadsorção.

Estas diferenças sugerem a existência de ligações e interações entre os grânulos e a CPF (Fig. 13).

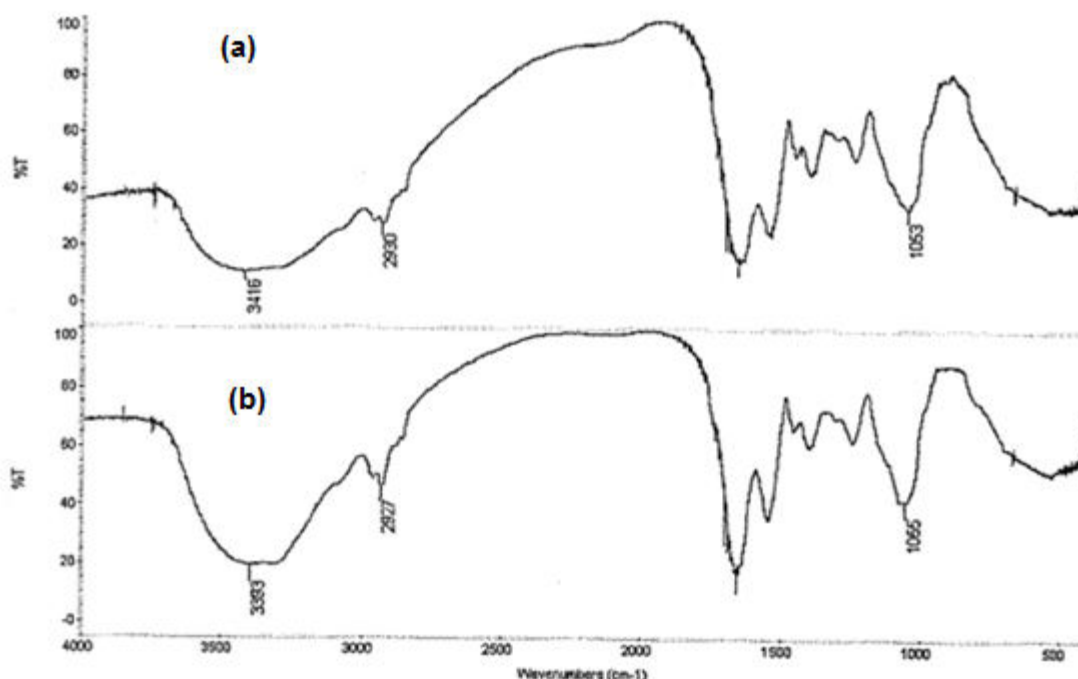


Fig. 13. Espectros no IV de grânulos: (a) antes da bioadsorção da CPF e (b) depois das experiências de bioadsorção com 800 µg L<sup>-1</sup>.

As diferenças mais notórias observadas na Fig. 13 surgem nas zonas de absorção entre 3000-3500 cm<sup>-1</sup>, a cerca de 2930 cm<sup>-1</sup> e cerca de 1055 cm<sup>-1</sup>. A zona de absorção entre 3000-3500 cm<sup>-1</sup> é típica das vibrações de alongamento das ligações O – H e N – H, correspondendo habitualmente a uma banda larga e intensa. A absorção em 2930 cm<sup>-1</sup> é típica das vibrações das ligações C – H de cadeias alifáticas (Wang et al. 2013), correspondendo habitualmente a bandas finas de absorção e de intensidade média. A absorção em 1055 cm<sup>-1</sup> ocorre com a ligação C – O saturada.

Em relação à zona de absorção entre 3000-3500 cm<sup>-1</sup>, o espectro dos grânulos aeróbios ativos sem CPF mostra um máximo em 3416 cm<sup>-1</sup> e o espectro dos grânulos aeróbios ativos com a CPF mostra um máximo em 3394 cm<sup>-1</sup>. Este facto evidencia um efeito batocrómico quando a CPF está presente. Além disso, em presença da CPF a banda é menos intensa, o que revela um efeito hipocrómico causado pela ligação da CPF aos grânulos. Uma vez que estas absorções são típicas da ligação O – H, pode admitir-se como possível que os efeitos

batocrômico e hipocrômico descritos evidenciem o comprometimento do grupo O – H numa ligação de hidrogénio entre a CPF e os grânulos.

Em relação à banda de absorção em  $2930\text{ cm}^{-1}$ , o espectro dos grânulos aeróbios ativos sem CPF mostra um máximo em  $2930\text{ cm}^{-1}$  que sofre um efeito batocrômico para  $2927\text{ cm}^{-1}$  no espectro dos grânulos aeróbios ativos com a CPF. Além disso, em presença da CPF a banda é mais intensa, o que revela um efeito hiperocrômico causado pela interação da CPF com os grânulos. Uma vez que esta absorção é típica das ligações C – H de cadeias alifáticas, pode admitir-se como possível que os efeitos batocrômico e hiperocrômico descritos evidenciem o comprometimento dos grupos C – H em interações hidrofóbicas entre a CPF e os grânulos (Wang et al. 2013).

Em relação à banda de absorção em  $1055\text{ cm}^{-1}$ , o espectro dos grânulos aeróbios ativos sem CPF mostra um máximo em  $1053\text{ cm}^{-1}$  que sofre um efeito hipsocrômico para  $1055\text{ cm}^{-1}$  no espectro dos grânulos aeróbios ativos com a CPF. Além disso, em presença da CPF a banda é menos intensa, o que revela um efeito hipocrômico causado pela interação da CPF com os grânulos. Uma vez que esta absorção é típica das ligações C – O saturadas, pode admitir-se como possível que os efeitos hipsocrômico e hipocrômico descritos evidenciem a possibilidade de estabelecimento de ligações de hidrogénio entre o átomo de oxigénio de grupos C – O e dadores de hidrogénio da CPF, como sejam os grupos carboxilo e amina secundária.

As ilações retiradas necessitariam de ser confirmadas por mais ensaios e, eventualmente, por outras técnicas analíticas.

#### **4. Conclusões**

Os métodos HPLC-FD e FTIR foram usados para avaliar o perfil de biossorção da CPF em grânulos aeróbios. As variáveis foram: concentração dos grânulos, dimensões da partícula, e temperatura. Os grânulos com a maior concentração mostram maior capacidade de biossorção da CPF. Os grânulos ativos menores de 1 mm removem mais CPF (44.6%) do que os grânulos com o tamanho entre 1-2 mm (36.9%). Os grânulos inativos menores de 1 mm removem menos CPF (34.9%) em relação aos grânulos com o tamanho entre 1-2 mm (28.6%) após 24 h. Os grânulos ativos mostraram uma tendência de adsorver e desadsorver CPF ao longo do tempo mas sempre na tendência crescente de adsorção.

Os modelos de pseudo primeira e segunda ordem foram aplicáveis para descrever o processo de biossorção da CPF em grânulos ativos enquanto que o modelo de pseudo



primeira ordem foi mais aplicável em grânulos inativos. A análise dos perfis experimentais e teóricos a 285 K revelou que o modelo de Freundlich foi o mais apropriado para a previsão dos perfis isotérmicos a esta temperatura. À 298 K o modelo de Langmuir, e Freundlich explicavam o processo de biosorção da CPF. À 313 K o modelo de Freundlich foi o mais apropriado no intervalo mais baixo de concentrações (25 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) enquanto que o modelo Langmuir foi o mais apropriado de 200 a 800  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Esta observação sugere que o processo de sorção por ocorrer a uma superfície homogênea às baixas concentrações mas o aumento da concentração teria provocado uma heterogeneidade na superfície dos grânulos que poderão ter ditado a mudança no modelo de biosorção. Os resultados à 298 K estão de acordo com os resultados dos estudos cinéticos que foram feitos à mesma temperatura. Estudos termodinâmicos indicaram que o processo de biosorção foi espontâneo e exotérmico. Pelo fato de  $\Delta H^0$  ter sido inferior a  $-40 \text{ kJ mol}^{-1}$  concluiu-se que a adsorção da CPF em grânulos é através do processo de quimissorção (adsorção química), embora a adsorção física também esteja presente. O fato de o processo ser espontâneo em todas as temperaturas estudadas, ser exotérmico (não precisar de grandes fornecimentos de calor para ocorrer), adsorver de forma química e física, propõe que os grânulos sejam promissores adsorventes ambientais da CPF e possivelmente outros compostos com estrutura similar. As análises FTIR confirmaram deslocamentos de algumas bandas, o que evidenciou a presença de interação dos grupos funcionais da CPF com os grânulos aeróbios ativos.

## BIBLIOGRAFIA

Adav SS, Lee DJ, Show KY & Tay JH. (2008). Aerobic granular sludge: recent advances. *Biotechnol Adv* 2008 Mai; 26 (5): 411-423.

Adav SS, Lee D-J & Lai J-Y. Treating chemical industries influent using aerobic granular sludge: recent development. *J Taiwan Inst Chem E* 2009 Fev; 40: 333-336.

Aksu Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochem* 2005 Abr; 40 (3-4): 997-1026.

Aksu Z. & Tunç Ö. Application of biosorption for penicillin G removal: comparison with activated carbon. *Process Biochem* 2005 Fev; 40 (2): 831-847.

APHA. Standard methods: for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation 1998, Whashington DC, USA.

Amorim CL, Maia AS, Mesquita RB, Rangel AO, van Loosdrecht MC, Tiritan ME et al. Performance of aerobic granular sludge in a sequencing batch bioreactor exposed to ofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin. *Water Res* 2014 Out; 50: 101-113.

Antunes M, Esteves VI, Guégan R, Crespo JS, Fernandes AN & Giovanela M. Removal of diclofenac sodium from aqueous solution by Isabel grape bagasse. *Chem Eng J* 2012 Abr; 192: 114-121.

Berglund B, Khan G A, Weisner S E, Ehde P M, Fick J. & Lindgren P E. Efficient removal of antibiotics in surface-flow constructed wetlands, with no observed impact on antibiotic resistance genes. *Sci Total Environ* 2014 Jan; 476-477: 29-37.

Crespo-Alonso M, Nurchi VM, Biesuz R, Alberti G, Spano N, Pilo MI, et al. Biomass against emerging pollution in wastewater: ability of cork for the removal of ofloxacin from aqueous solutions at different pH. *JECE* 2013 Set; (artigo na imprensa).

de Kreuk MK, Heijnen JJ & van Loosdrecht MC. Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge. *Biotechnol Bioeng* 2005 Abr; 90 (6): 761-769.

Doménech E, Jimenez-Belenguer A, Amoros JA., Ferrus MA & Escriche I. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains isolated in ready-to-eat foods in Eastern Spain. *Food Control* 2015 Jul; 47: 120-125.

Dorival-Garcia N, Zafra-Gomez A, Navalon A, Gonzalez J & Vilchez JL. Removal of quinolone antibiotics from wastewaters by sorption and biological degradation in laboratory-scale membrane bioreactors. *Sci Total Environ* 2013 Nov; 442: 317-328.

Gao D, Liu L, Liang H & Wu WM. Aerobic granular sludge: characterization, mechanism of granulation and application to wastewater treatment. *Crit Rev Biotechnol* 2011Mai; 31 (2): 137-152.

Gao JF, Zhang Q, Su K & Wang JH. Competitive biosorption of Yellow 2G and Reactive Brilliant Red K-2G onto inactive aerobic granules: simultaneous determination of two dyes by first-order derivative spectrophotometry and isotherm studies. *Bioresour Technol* 2010 Mar; 101 (15): 5793-5801.

Gao JF, Zhang Q, Wang JH, Wu XL, Wang SY & Peng YZ. Contributions of functional groups and extracellular polymeric substances on the biosorption of dyes by aerobic granules. *Bioresour Technol* 2011 Ago; 102 (2): 805-813.

Gao J, Zhang Q, Su K, Chen R & Peng Y. Biosorption of Acid Yellow 17 from aqueous solution by non-living aerobic granular sludge. *J Hazard Mater* 2010 Set, 174 (1-3): 215-225.

Fan H, Li J, Zhang L & Feng L. Contribution of sludge adsorption and biodegradation to the removal of five pharmaceuticals in a submerged membrane bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 2014 Abr; 88: 101-107

FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 2001. Disponível em <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf> [accedido em 12/06/2013].

Girardi C, Greve J, Lamshoft M, Fetzner I, Miltner A, Schaffer A et al. Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. J Hazard Mater 2011 Out; 198: 22-30.

Ho YS, Mc Kay G. Pseudo-second order model for sorption processes. Process Biochem 1999 34, 451–465.

ICH. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology 1996. Disponível em <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073384.pdf> [acedido em 12/06/2013]

Kumar M, Tamilarasan R & Sivakumar V. Adsorption of Victoria blue by carbon/Ba/alginate beads: kinetics, thermodynamics and isotherm studies. Carbohydr Polym 2013 Jun; 98 (1): 505-513.

Lagergren S. About the theory of so-called adsorption of soluble substances. Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens. Handlingar 1898. 24(4), 1–39.

Langmuir I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. J Am Chem Soc 1916, 3: 2221–2295.

Liu Y, Yang S-F, Tan S-F, Lin Y-M and Tay J-H. Aerobic granules: a novel zinc biosorbent. Letters in Applied Microbiology 2002 Out; 35: 548-551.

Maia AS, Ribeiro AR, Amorim CL, Barreiro JC, Cass QB, Castro PM, et al. Degradation of fluoroquinolone antibiotics and identification of metabolites/transformation products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 2014 Jan; 1333: 87-98.

Marti E, Huerta B, Rodriguez-Mozaz S, Barcelo D, Jofre J. & Balcazar JL. Characterization of ciprofloxacin-resistant isolates from a wastewater treatment plant and its receiving river. Water Res 2014 Mai; 61: 67-76.

Meneghel AP, Gonçalves Jr. AC, Strey L, Rubio F, Schwantes D & Casarin J. Biosorption and removal Of chromium from water by using moringa seed cake (*Moringa oleifera* Lam.). Quim. Nova 2013 Jul; 36 (8): 1104-1110.

Michalak I, Chojnacka K & Witek-Krowiak A.. State of the art for the biosorption process--a review. Appl Biochem Biotechnol 2013 Mai; 170 (6): 1389-1416.

Olivella MA, Jove P, Bianchi A, Bazzicalupi C & Cano L. An integrated approach to understanding the sorption mechanism of phenanthrene by cork. Chemosphere 2013 Nov; 90 (6): 1939-1944.

Onal Y, Akmil-Basar C & Sarici-Ozdemir C. Elucidation of the naproxen sodium adsorption onto activated carbon prepared from waste apricot: kinetic, equilibrium and thermodynamic characterization. J Hazard Mater 2007 Mar; 148 (3): 727-734.

Patel R & Suresh S. Kinetic and equilibrium studies on the biosorption of reactive black 5 dye by *Aspergillus foetidus*. Bioresour Technol Jan, 2008; 99 (1): 51-58.

Reddy DHK, Sessaiah K, Reddy AVR & Lee SM. Optimization of Cd(II), Cu(II) and Ni(II) biosorption by chemically modified *Moringa oleifera* leaves powder. Carbohydr Polym 2012 Jan; 88 (3): 1077-1086.

Saini AS & Melo JS. Biosorption of uranium by melanin: Kinetic, equilibrium and thermodynamic studies. Bioresour Technol 2013 Set; 149: 155-162.

Sawalha MF, Peralta-Videa JR, Romero-Gonzalez J & Gardea-Torresdey JL. Biosorption of Cd(II), Cr(III), and Cr(VI) by saltbush (*Atriplex canescens*) biomass: thermodynamic and isotherm studies. J Colloid Interface Sci 2006 Mar; 300 (1): 100-104.

Seviour T, Yuan van Loosdrecht ZMC & Lin Y. Aerobic sludge granulation: a tale of two polysaccharides? Water Res 2012 Jun; 46 (15): 4803-4813.

Suriyanon N, Punyapalakul P & Ngamcharussrivichai C. Mechanistic study of diclofenac and carbamazepine adsorption on functionalized silica-based porous materials. Chem Eng J 2013 Nov; 214: 208-218.

Vijayaraghavan K & Yun YS. Bacterial biosorbents and biosorption. Biotechnol Adv 2008 Feb; 26 (3): 266-291.

Villaescusa I, Fiol N, Poch J, Bianchi A. & Bazzicalupi C. Mechanism of paracetamol removal by vegetable wastes: The contribution of  $\pi$ – $\pi$  interactions, hydrogen bonding and hydrophobic effect. Desalination 2011 Dec; 270 (1-3): 135-142.

von Eyser C, Börgers A, Richard J, Dopp E, Janzen N, Bester K, et al. Chemical and toxicological evaluation of transformation products during advanced oxidation processes (2013) Water Science and Technology 68 (9):1976-1983.

von Sonntag C. Advanced oxidation processes: Mechanistic aspects Water Science and Technology 2008; 58 (5): 1015-1021.

Wang L, Wan C, Lee D-J, Tay J-H, Chen XF, Liu XW, et al. Adsorption–desorption of strontium from waters using aerobic granules. J Taiwan Inst Chem E 2013 Feb; 44 (3): 454-457.

Weber WJ & Morris JC. Journal of the Sanitary Engineering Division. Proceedings of the. American Society of Civil Engineers 1963; 89: 31–59.

Wu Y, Li T & Yang L. Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: a review. Bioresour Technol 2012 Dec; 107: 10-18.

Wu Q, Li Z, Hong H, Li R, Jiang W-T. Desorption of ciprofloxacin from clay mineral surfaces Water Res 2013 Out; 47 (1): 259-268.

Yang Y, Jin D, Wang G, Liu D, Jia X. & Zhao Y. Biosorption of Acid Blue 25 by unmodified and CPC-modified biomass of *Penicillium* YW01: kinetic study, equilibrium isotherm and FTIR analysis. Colloids Surf B Biointerfaces 2011 Jul; 88 (1): 521-526.

Yang W, Zhou H & Cicek N. Treatment of Organic Micropollutants in Water and Wastewater by UV-Based Processes: A Literature Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2014 Mai; 44 (13): 1443-1476.

Yeddou-Mezenner N. Kinetics and mechanism of dye biosorption onto an untreated antibiotic waste. *Desalination* 2010 Jul; 262 (1-3): 251-259.

Zhanel GG, Ennis K, Vercaigne L, Walkty A, Gin AS, Embil J, et al. A critical review of the fluoroquinolones: focus on respiratory tract infections. *Drugs* 2002 Jan; 62 (1): 13-59.

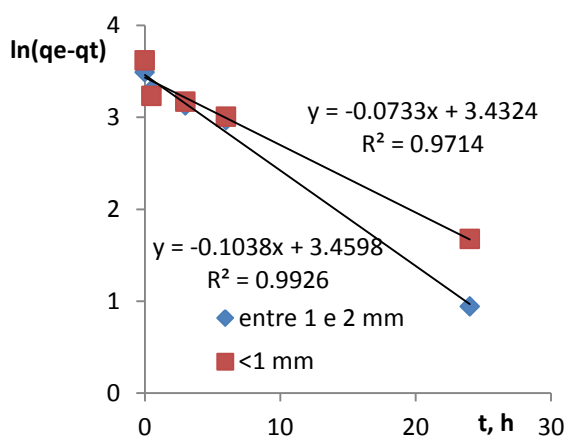
Zhang Q, Zhao L, Dong YH & Huang GY. Sorption of norfloxacin onto humic acid extracted from weathered coal. *J Environ Manage* 2012 Mar; 102: 165-172.

Zhang Y & Geissen SU. Elimination of carbamazepine in a non-sterile fungal bioreactor. *Bioresour Technol* 2012 Fev; 112: 221-227.

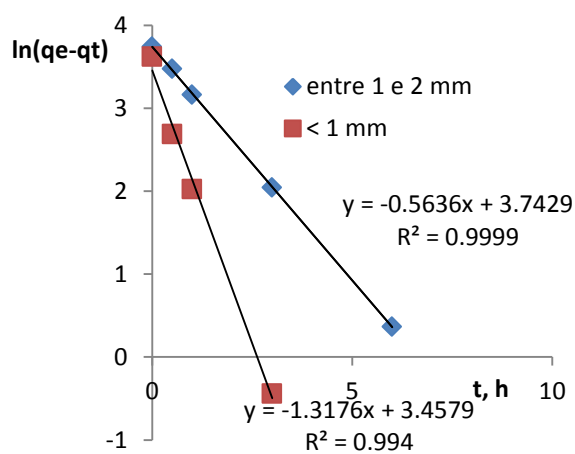
Zhu L, Qi HY, Lv ML, Kong Y, Yu YW & Xu, XY. Component analysis of extracellular polymeric substances (EPS) during aerobic sludge granulation using FTIR and 3D-EEM technologies. *Bioresour Technol* 2012 Ago; 124: 455-459.

## ANEXOS

### I. Cinéticas de primeira ordem (a) grânulos aeróbios ativos (b) grânulos inativos.

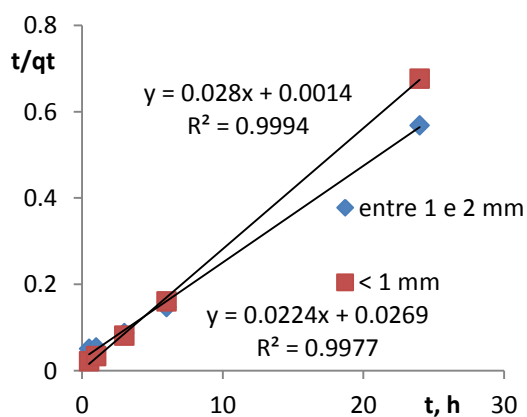


(b)

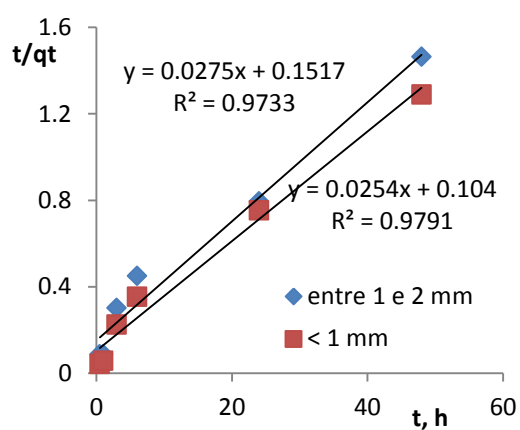


(b)

### II. Cinéticas de segunda ordem (a) grânulos aeróbios ativos (b) grânulos inativos.



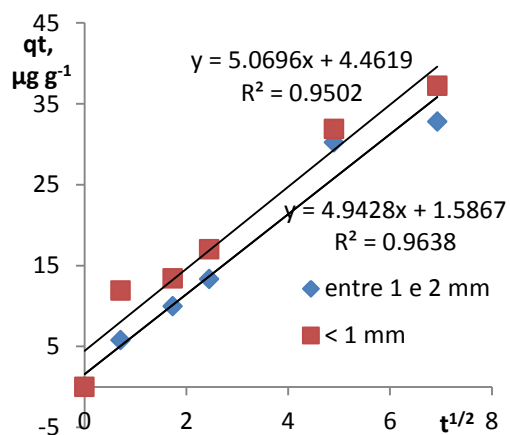
(a)



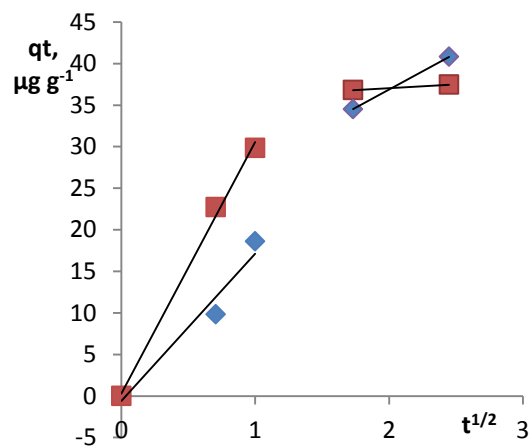
(b)



III. Modelo de difusão intrapartícula de Weber e Morris para (a) grânulos aeróbios ativos (b) grânulos inativos

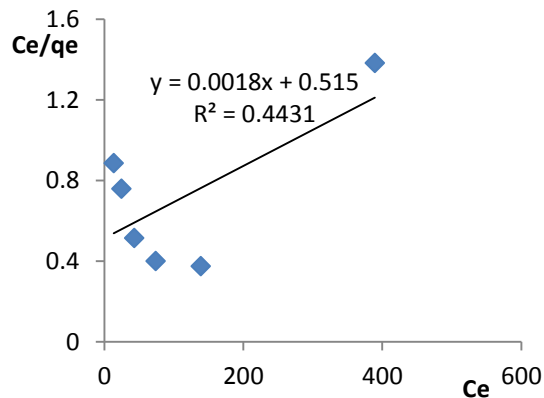


(a)

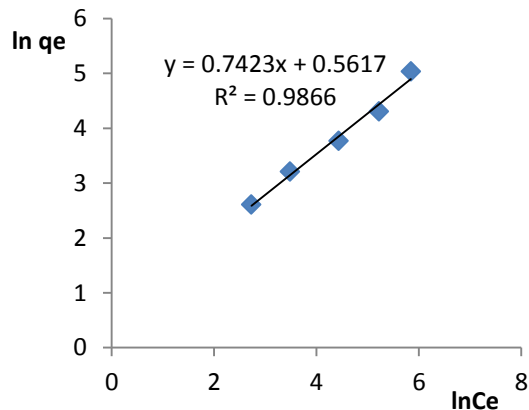


(b)

IV. Isotermas de Langmuir (a) e Freundlich (b) para a biosorção da CPF em grânulos aeróbios a 285 °C.

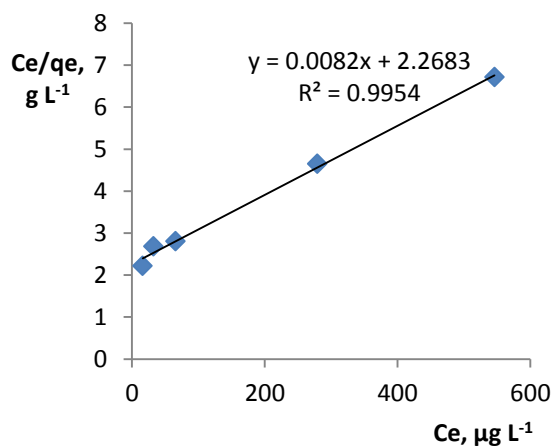


(a)

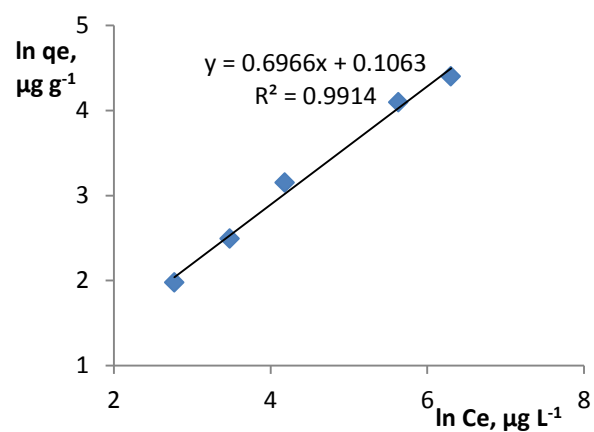


(b)

V. Isotermas de adsorção de Langmuir (a) e Freundlich (b) para a biosorção da CPF em grânulos aeróbios ativos a 298 K.

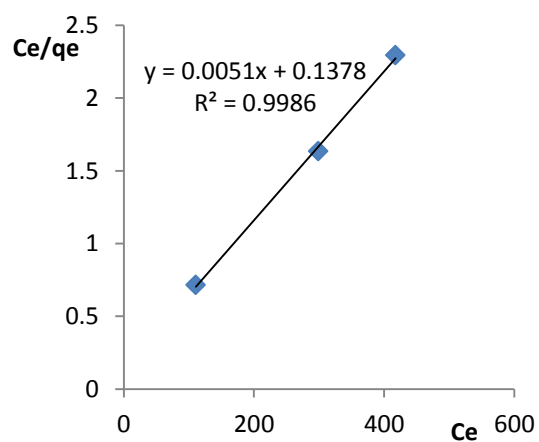


(a)

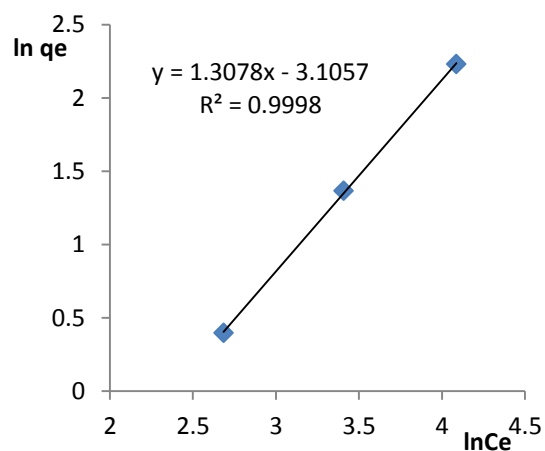


(b)

VI. Isotermas de adsorção de Langmuir ( $25 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (a) e Freundlich ( $200 - 800 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (b) para a biosorção da CPF em grânulos aeróbios ativos a 313 K.

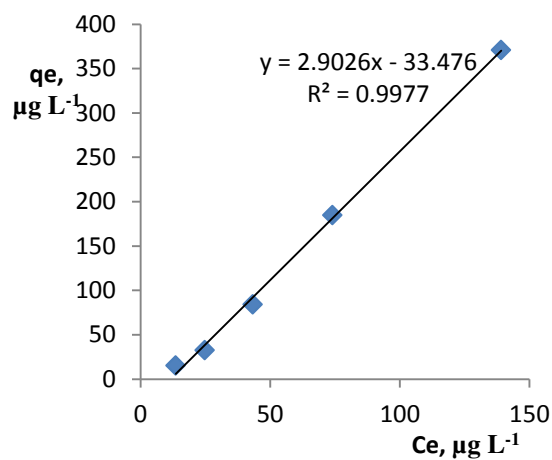


(a)

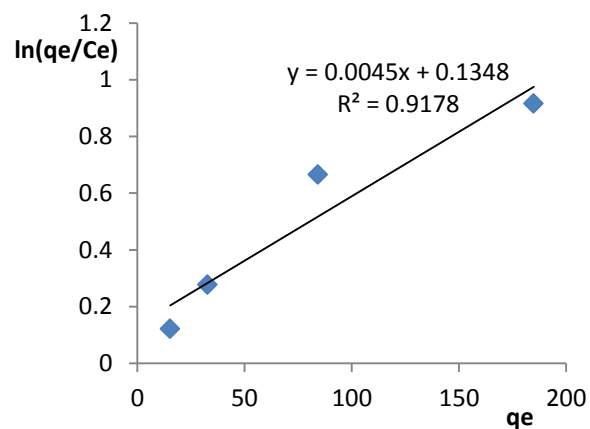


(b)

VII. Adsorção de CPF em grânulos aeróbicos ativos. Gráfico  $q_e$  vs  $C_e$  (a) e Khan e Singh (b) para o cálculo do coeficiente de distribuição a 285 K.

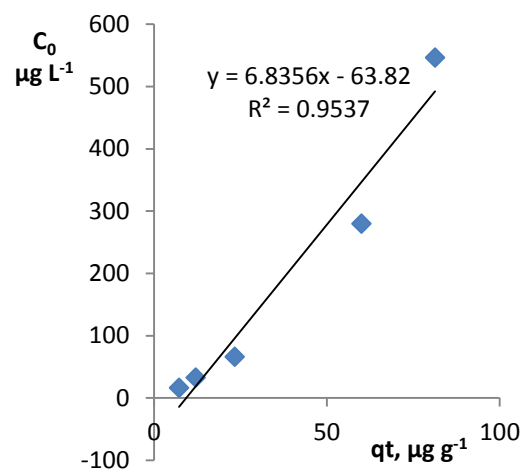


(a)

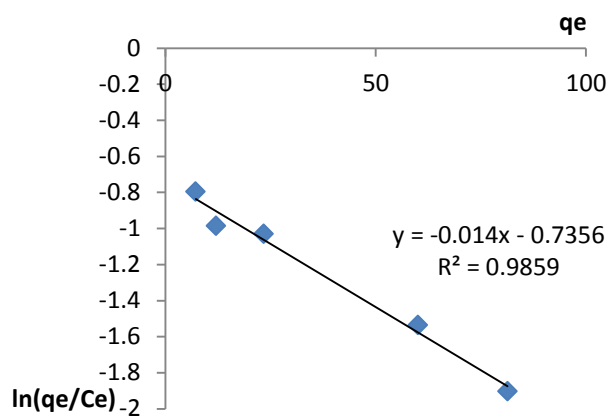


(b)

VIII. Adsorção de CPF em grânulos aeróbicos ativos. Gráfico  $q_e$  vs  $C_e$  (a) e Khan e Singh (b) para o cálculo do coeficiente de distribuição a 298 K.

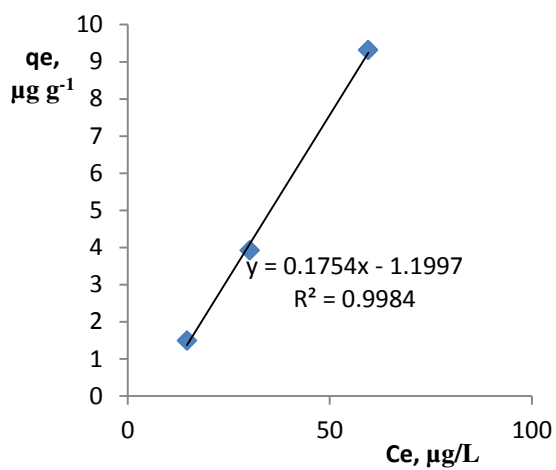


(a)

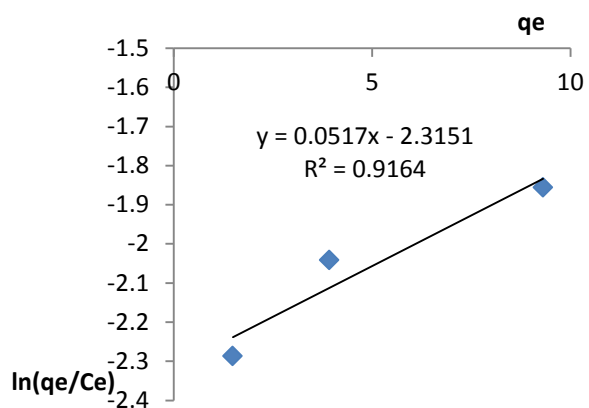


(b)

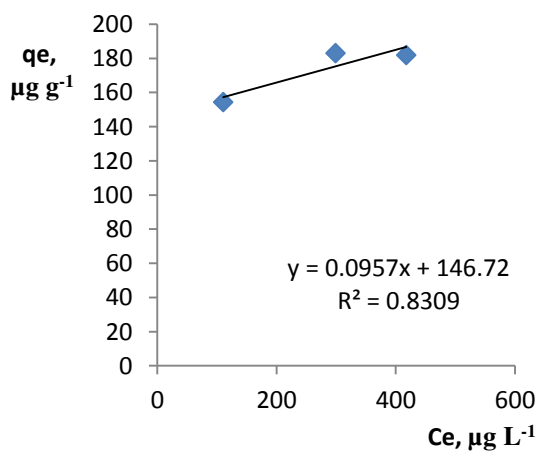
IX. Adsorção de CPF em grânulos aeróbicos ativos. Gráfico  $q_e$  vs  $C_e$  (a) e Khan e Singh (b) nas concentrações de 25-100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ;  $q_e$  vs  $C_e$  (c) e Khan e Singh (d) nas concentrações de 200-800  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para o cálculo do coeficiente de distribuição a 313 K.



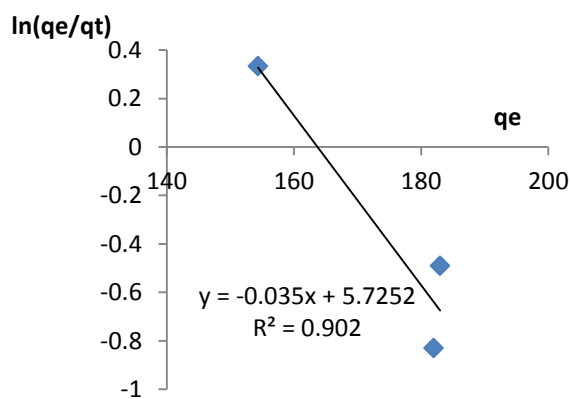
(a)



(b)



(c)



(d)

X. Gráfico de Van't Hoff de adsorção da CPF em grânulos aeróbios ativos.

